

Dissertation

# **Funktionelle Charakterisierung der humanen Tryptophanhydroxylase 2**

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I

**Katja Tenner**

Dekan: Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter:      1. Prof. Dr. Wolfgang Lockau  
                     2. Prof. Dr. Michael Bader  
                     3. Prof. Dr. Wolfgang Höhne

eingereicht:      19.04.2007

Datum der Promotion: 28.08.2007

## Zusammenfassung

Die Tryptophanhydroxylase (TPH) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese des wichtigen Neurotransmitters Serotonin. Kürzlich wurde ein zweites TPH-Isozym, die TPH2, entdeckt. Es stellte sich heraus, dass dieses Isozym für die Serotoninsynthese im Zentralnervensystem verantwortlich ist, wohingegen die zuvor bekannte TPH1 lediglich der Ausgangspunkt der Serotoninsynthese in den peripheren Geweben ist. Da Störungen im Serotoninstoffwechsel mit einer Vielzahl von psychiatrischen Erkrankungen, wie beispielsweise depressiven Störungen, in Verbindung gebracht werden, rückt nun die als neuronales Enzym identifizierte TPH2 in den Fokus der Forschung. Als Grundlage für die pharmakologische Beeinflussung des serotonergen Systems im Zentralnervensystem ohne Einflussnahme auf die Peripherie ist die Identifizierung von Unterschieden zwischen den beiden Isozymen unerlässlich.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TPH2 nicht nur im Zentralnervensystem, sondern auch im Hoden exprimiert wird, und dass TPH1 und 2 sich nicht nur in ihren Expressionsorten sondern auch in ihren grundlegenden biochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Dabei stellte sich die TPH1 als aktiveres der beiden Enzyme heraus. Der in der TPH1 nicht vorhandene, 44 Aminosäuren lange N-Terminus der TPH2 konnte als auf die Enzymaktivität stark inhibierend wirkende Domäne identifiziert werden. Der C-Terminus stellte sich als der für die Oligomerisierung der TPH2 verantwortliche Teil des Enzyms heraus. Dabei ist die Oligomerisierung für die katalytische Aktivität nicht essentiell, der C-Terminus beinhaltet allerdings zusätzlich Sequenzen, die zwar nicht direkt an der Katalyse oder der Oligomerisierung beteiligt sind, aber eine entscheidende Bedeutung für die Aktivität des Enzyms haben. Es konnte die Existenz von mindestens zwei Proteinkinase A-Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden, wobei die Phosphorylierung aber ohne Einfluss auf die Enzymaktivität zu sein scheint. Durch ihren entscheidenden Einfluss auf die TPH2-Aktivität stellten sich der N- und C-Terminus der TPH2 als interessante Angriffspunkte für die pharmakologische Beeinflussung heraus, wobei der N-Terminus als TPH2-spezifische Struktur eine gezielte Beeinflussung des serotonergen Systems im Zentralnervensystem ohne Auswirkungen auf das periphere System ermöglichen würde. Die im Hoden detektierte TPH2-Expression führt, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, aufgrund der in diesem Gewebe fehlenden Weitermetabolisierung des durch die TPH2 synthetisierten 5-Hydroxytryptophan nicht zur Serotoninbildung.

Als erster Schritt auf dem Weg zur Identifizierung von TPH-aktivitätsmodulierenden Substanzen konnte ein auf einem fluorometrischen Prinzip basierender High-Throughput-Assay zur Bestimmung der TPH-Aktivität entwickelt werden.

Tubulin $\beta$ 2A konnte als bis dahin unbekannter Interaktionspartner der TPH2 identifiziert werden, der vermutlich den axonalen Transport der TPH aus dem Soma in die Synapsenregion der Neuronen vermittelt.

Die Auswirkungen eines *in vitro* aktivitätssenkenden *Tph2*-SNPs auf die Serotoninlevel und das Verhalten verschiedener Mausstämmen konnte durch die Generierung und Untersuchung von congenen Mäusen als unbedeutend eingestuft werden.

Ferner konnte die Expression von TPH1-mRNA als Marker für endometriale Karzinome identifiziert werden.

Schlagwörter:

Tryptophanhydroxylase, Serotonin, Domänen, Verhalten, Interaktionspartner

## Abstract

Tryptophan hydroxylase (TPH) catalyzes the rate limiting step of the synthesis of the important neurotransmitter serotonin. Recently a new TPH isoenzyme, TPH2, was discovered. It turned out that this isoenzyme is responsible for the serotonin synthesis within the central nervous system, whereas the formerly known TPH1 is merely the starting point of serotonin synthesis in peripheral tissues. Since dysfunction in the metabolism of serotonin is related to a large number of psychiatric diseases, for example depressive disorders, the neuronal TPH2 moved into the centre of interest. As a basis for the pharmacological manipulation of the central nervous serotonergic system, without influencing the periphery, the identification of differences between the two isoenzymes is essential.

In this thesis it was shown that TPH2 is not only expressed in the central nervous system but also in the testis and that TPH1 and 2 not only differ in their expression sites but also in their basic biochemical characteristics. TPH1 turned out to be the more active enzyme. The 44 amino acid N-terminus of TPH2, which is absent in TPH1, could be identified as a domain that strongly inhibits enzymatic activity. The C-terminus turned out to be responsible for the oligomerization of TPH2. However, oligomerization is not essential for the catalytic activity. Nevertheless, the C-terminus contains sequences that are not involved in the catalytic reaction or the oligomerization process but are crucial for the enzyme's activity. The existence of at least two protein kinase A phosphorylation sites could be verified, whereas the phosphorylation doesn't seem to have any influence on the enzymatic activity. Due to their powerful impact on TPH2 activity the N- and C-termini of TPH2 became interesting targets for pharmacological interference, whereas the N-terminus as a TPH2 specific structure would facilitate the manipulation of the central nervous serotonergic system without exerting influence on the peripheral system. The TPH2 expression, detected within the testis, does not result in the synthesis of serotonin, because 5-hydroxy-tryptophan is not further metabolized in this tissue.

As a first step on the way to the identification of TPH activity modulating substances, a high throughput assay for determination of TPH activity, based on a fluorometric principle, was developed.

Tubulin $\beta$ 2A was identified as a so far unknown TPH2 interaction partner, which probably mediates the transport of TPH2 from the cell body to the synaptic region of the neurons.

The effect of a SNP in the *Tph2* gene that decreases the TPH2 activity *in vitro* on the serotonin level and the behaviour of different mouse strains could be rated as insignificant by the generation of congenic mice.

Furthermore, the expression of TPH1 mRNA was identified as a marker for endometrial cancer.

Keywords:

tryptophan hydroxylase, serotonin, domains, behaviour, interaction partners

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>12</b>
1.1 DAS SEROTONERGE SYSTEM .....	12
1.2 MONOAMINE DES SEROTONERGEN SYSTEMS.....	14
1.2.1 Serotonin (5-HT).....	14
1.2.1.1 5-HT-Verteilung im Organismus .....	15
1.2.1.2 Funktionen des 5-HT in Peripherie und ZNS.....	16
1.2.2 Tryptophan (Trp).....	16
1.2.3 5-Hydroxytryptophan (5-HTP).....	17
1.2.4 Melatonin .....	17
1.3 ENZYME DES SEROTONERGEN SYSTEMS.....	18
1.3.1 Tryptophanhydroxylasen.....	18
1.3.1.1 Die Familie der Aromatischen-Aminosäure-Hydroxylasen (AAAH) .....	18
1.3.1.2 Entdeckung des zweiten TPH-Isozyms .....	18
1.3.1.3 Basale Daten zur TPH.....	20
1.3.1.4 Domänenstruktur der hTPH1 .....	21
1.3.1.5 Tetramerisierung der TPHs .....	23
1.3.1.6 Regulierung der TPH-Aktivität über Substratkontrolle.....	23
1.3.1.7 Regulierung der TPH1-Aktivität durch Phosphorylierung.....	24
1.3.2 Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AAAD) .....	25
1.3.3 Serotonin-N-Acetyltransferase (NAT) .....	25
1.3.4 Monoaminoxidase (MAO).....	25
1.3.5 Transglutaminase (TG) .....	26
1.4 TRANSPORTER DES SEROTONERGEN SYSTEMS.....	26
1.4.1 Transporter für große neutrale Aminosäuren (LAAT).....	27
1.4.2 Vesikulärer Monoamintransporter (VMAT) .....	27
1.4.3 Serotonintransporter (SERT) .....	28
1.5 REZEPTOREN DES SEROTONERGEN SYSTEMS.....	28
1.6 PATHOLOGIE DES SEROTONERGEN SYSTEMS .....	31
1.6.1 Pathologie des peripheren serotonergen Systems .....	31
1.6.2 Pathologie des neuronalen serotonergen Systems.....	32
1.6.2.1 Funktionelle TPH2-SNPs im Menschen.....	36
1.6.2.2 Funktionelle TPH2-SNPs in der Maus .....	37
1.6.2.3 Mausmodelle zur Untersuchung von Depression und anderen psychiatrischen Erkrankungen.....	38
1.7 ZIELSETZUNG .....	40

<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>41</b>
2.1	MATERIAL .....	41
2.1.1	Chemikalien .....	41
2.1.2	Kits, Enzyme und Marker.....	43
2.1.3	Antikörper .....	44
2.1.4	Vektoren.....	44
2.1.5	Primer .....	45
2.1.6	Peptide .....	45
2.1.7	Zelllinien .....	45
2.1.8	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	46
2.2	METHODEN .....	47
2.2.1	Nukleinsäuren .....	47
2.2.1.1	Isolierung von Nukleinsäuren .....	47
2.2.1.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	47
2.2.1.1.2	Isolierung von genomischer DNA aus Geweben, Zellen und Blutproben .....	48
2.2.1.1.3	Isolierung von RNA aus Geweben und Zellen .....	49
2.2.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	49
2.2.1.3	Lagerung von Nukleinsäuren .....	49
2.2.1.4	Auftrennung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Gelen.....	50
2.2.1.4.1	Auftrennung von DNA mit Hilfe von Agarosegelen .....	50
2.2.1.4.2	Auftrennung von DNA mit Hilfe von Polyacrylamidgelen .....	50
2.2.1.4.3	Auftrennung von RNA .....	50
2.2.1.5	Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	50
2.2.1.6	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren.....	51
2.2.1.7	Ligation von Nukleinsäuren .....	51
2.2.1.8	Sequenzierung.....	51
2.2.1.9	Reverse Transkription .....	52
2.2.1.10	Polymerasekettenreaktion .....	53
2.2.1.10.1	PCR zur Genotypbestimmung.....	53
2.2.1.10.2	PCR kleiner Fragmente .....	54
2.2.1.10.3	PCR zur Klonierung großer Fragmente (Long Range PCR) .....	56
2.2.1.10.4	Gerichtete Mutagenese.....	58
2.2.1.11	RACE-PCR.....	60
2.2.1.12	Ribonuklease-Protection-Assay .....	60
2.2.1.12.1	Vorbereitung der RNA.....	61
2.2.1.12.2	Sondenherstellung .....	61
2.2.1.12.3	Hybridisierung .....	62
2.2.1.12.4	Aufarbeitung .....	62
2.2.2	Proteinbiochemie .....	62
2.2.2.1	Isolierung von Proteinen aus Zellen .....	62
2.2.2.2	Isolierung von Proteinen aus Geweben .....	63
2.2.2.3	Immunopräzipitation .....	63
2.2.2.4	Phosphorylierung von Proteinen mittels Proteinkinase A .....	64
2.2.2.5	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode .....	64
2.2.2.6	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	64

2.2.2.7	Proteinnachweis mittels Coomassie Färbung .....	65
2.2.2.8	Blotten von Proteinen.....	65
2.2.2.9	Blocken von Membranen .....	65
2.2.2.10	Inkubation mit primären Antikörpern .....	66
2.2.2.11	Inkubation mit sekundären Antikörpern.....	66
2.2.2.12	ECL-Reaktion .....	66
2.2.2.13	Immunhistochemie .....	67
2.2.2.14	Immuncytochemie .....	68
2.2.3	<i>Bakterien</i> .....	68
2.2.3.1	Bakterienstämme.....	68
2.2.3.2	Transformation von Bakterien.....	68
2.2.3.3	Vermehrung und Selektion von Bakterien.....	68
2.2.3.3.1	Vermehrung auf Platten.....	68
2.2.3.3.2	Vermehrung in flüssigen Medien.....	69
2.2.3.4	Überexpression von Proteinen in Bakterien .....	69
2.2.4	<i>Zellkultur</i> .....	70
2.2.4.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	70
2.2.4.2	Aussaat eingefrorener Zellen .....	70
2.2.4.3	Mediumwechsel .....	70
2.2.4.4	Passagieren von Zellen.....	71
2.2.4.5	Einfrieren und Lagerung von Zellen .....	71
2.2.4.6	Transfektion von Zellen .....	71
2.2.4.6.1	Transfektion mittels Lipofectamine™2000.....	71
2.2.5	<i>Tryptophanhydroxylase-Aktivitäts-Assay</i> .....	71
2.2.6	<i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i> .....	73
2.2.6.1	Probenaufarbeitung für die HPLC.....	73
2.2.6.2	5-HT-Detektion mittels HPLC .....	73
2.2.7	<i>Yeast-Two-Hybrid (Y2H) Screening</i> .....	74
2.2.8	<i>Tierversuche</i> .....	76
2.2.8.1	Tierstämme und Tierhaltung .....	76
2.2.8.2	Rückkreuzung .....	76
2.2.8.3	Verhaltenstests.....	76
2.2.8.3.1	Forced Swimming Test (FST) .....	76
2.2.8.3.2	Elevated Plus Maze Test (PM) .....	77
2.2.8.4	Tötung und Organentnahme.....	77
2.2.8.5	Isolierung von Thrombozyten aus dem Blut .....	77
2.2.9	<i>Quantifizierung</i> .....	77
2.2.10	<i>Statistik</i> .....	78
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>79</b>
3.1	EXPRESSION DER TPH .....	79
3.1.1	<i>Expressionsmuster der TPH-Isozyme in Ratte und Maus</i> .....	79
3.1.2	<i>TPH im Hoden</i> .....	80
3.1.2.1	5-HT und 5-HTP im Hoden von TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen .....	80
3.1.2.2	TPH2 im Hoden von TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen.....	80
3.1.2.3	AAAD im Hoden von TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen .....	81

3.1.2.4	Funktionslose TPH2-Splicevariante im Rattenhoden.....	82
3.1.3	<i>Alternatives Splicing der TPH2 in Rattenhirn und -hoden</i> .....	83
3.2	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER TPH .....	86
3.2.1	<i>Herstellung der TPH-Konstrukte</i> .....	86
3.2.2	<i>Kinetiken und <math>K_m</math>-Werte der TPH Enzyme und ihrer Mutanten</i> .....	87
3.2.3	<i>Der TPH2-C-Terminus</i> .....	89
3.2.3.1	Auswirkung verschiedener C-terminaler Deletionen auf die TPH2-Aktivität.....	89
3.2.3.2	Auswirkung verschiedener C-terminaler Deletionen auf die TPH2-Oligomerisierung.....	89
3.2.3.3	Effekte von C-terminalem Peptid auf die TPH2-Aktivität und -oligomerisierung .....	90
3.2.4	<i>Der TPH2-N-Terminus</i> .....	91
3.2.4.1	Auswirkung einer N-terminalen Deletion auf die TPH2-Aktivität.....	91
3.2.4.2	Effekt von N-terminalem Peptid auf die TPH2-Aktivität.....	91
3.2.5	<i>Phosphomutanten der TPH2</i> .....	92
3.2.5.1	Aktivität der Phosphomutanten.....	92
3.2.5.2	Phosphorylierung der TPH und durch PKA .....	93
3.2.5.3	Stabilität der TPH-Isozyme und ihrer Mutanten.....	93
3.3	TPH IN DER PATHOGENESE .....	94
3.3.1	<i>Störungen der serotonergen Systems in einer Patientin</i> .....	94
3.3.1.1	Serotonin und Melatoninmessung in der Patientenproben .....	94
3.3.1.2	Genotypisierung der Patientin.....	95
3.3.1.2.1	TPH1 .....	95
3.3.1.2.2	SERT .....	95
3.3.2	<i>TPH in endometrialen Karzinomen</i> .....	96
3.3.2.1	TPH-Expression in endometrialen und myometrialen Gewebeproben von endometrialen Tumoren.....	96
3.3.2.2	Serotonin in endometrialen Karzinomen.....	98
3.3.2.3	Morphologische Begutachtung der endometrialen Karzinome .....	98
3.3.2.4	Östrogenrezeptoren Immunohistochemie von endometrialen Karzinomen.....	99
3.3.2.5	Signifikante Merkmale der endometrialen Karzinome der Kategorien I und IV.....	99
3.3.2.6	SERT-Expression in endometrialen Karzinomen .....	100
3.3.2.7	NAT-Expression in endometrialen Karzinomen.....	100
3.3.2.8	MAO-A-Expression in endometrialen Karzinomen.....	100
3.3.2.9	TG2-Expression in endometrialen Karzinomen .....	101
3.3.2.10	VMAT1- und 2-Expression in endometrialen Karzinomen.....	101
3.3.2.11	Zusammenfassung der Merkmale der endometrialen Karzinome der Kategorien I und IV .....	102
3.3.3	<i>Einfluss eines mTPH2 SNPs auf das serotonerge System und Verhalten von Mäusen</i> .....	102
3.3.3.1	Klonierung der TPH-Allelformen mTPH2 <sub>1473C</sub> und mTPH2 <sub>1473G</sub> .....	103
3.3.3.2	Bestimmung der kinetischen Parameter der mTPH2 <sub>447P</sub> und mTPH2 <sub>447R</sub> .....	103
3.3.3.3	Rückkreuzung auf des 1473G-Allels auf den C57BL/6 Background.....	104
3.3.3.4	Verhaltenstests mit 1473C/C und 1473G/G Mäusen.....	105
3.3.3.5	5-HT-Gehalt der Hirne von 1473C/C und 1473G/G Mäusen.....	105
3.3.3.6	TPH2-Expression in den Hirnen von 1473C/C und 1473G/G Mäusen .....	107
3.4	HIGH-THROUGHPUT-ASSAY ZUR BESTIMMUNG DER TPH-AKTIVITÄT.....	107
3.4.1	<i>TPH, 5-HT und 5-HTP in verschiedenen Zelllinien</i> .....	108
3.4.1.1	TPH1- und TPH2-Expression in verschiedenen Zelllinien .....	108
3.4.1.2	5-HT und 5-HTP in verschiedenen Zelllinien .....	109

3.4.2	Testung des fluorometrischen Messprinzips .....	110
3.4.3	TPH-Aktivitätsassay mit dem TPH-Inhibitor PCPA und 7-HTP .....	111
3.5	Y2H-SCREENING NACH TPH2-INTERAKTIONSPARTNERN .....	112
3.5.1	Domänenunterteilung der TPH2 für das Y2H-Screening.....	112
3.5.2	Resultate des Y2H-Screenings.....	112
3.5.3	Überprüfung der möglichen TPH2-Interaktionspartner durch Koimmunopräzipitation.....	113
3.5.4	Kolokalisation von TPH2 und TUBB.....	114
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>115</b>
4.1	EXPRESSION DER TPH .....	115
4.1.1	Expressionsmuster der TPH-Isozyme in Ratte und Maus .....	115
4.1.2	TPH im Hoden .....	115
4.1.3	Alternatives Splicing der TPH2 in Rattenhirn und -hoden .....	116
4.2	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER TPH .....	117
4.2.1	Kinetische Charakterisierung von TPH1 und 2 .....	118
4.2.2	Bedeutung des C-Terminus für die TPH2-Aktivität.....	119
4.2.3	Bedeutung des N-Terminus für die TPH2-Aktivität.....	122
4.2.4	Phosphorylierung der TPH2 durch PKA .....	124
4.2.5	Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse über die biochemischen Eigenschaften der TPH2 und deren Bedeutung.....	125
4.3	TPH IN DER PATHOGENESE .....	127
4.3.1	Störung der serotonergen Systems einer Patientin.....	127
4.3.2	TPH1 in endometrialen Karzinomen .....	128
4.3.3	Einfluss eines mTPH2 SNPs auf das serotonerge System und Verhalten von Mäusen.....	130
4.4	HIGH-THROUGHPUT-ASSAY ZUR BESTIMMUNG DER TPH-AKTIVITÄT.....	132
4.5	TUBULINB2A – EIN TPH2 INTERAKTIONSPARTNER.....	134
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>137</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>151</b>
	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>152</b>
	<b>PATENTE .....</b>	<b>152</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>153</b>



# Abkürzungsverzeichnis

Akronym	Bedeutung
129S/v	ein Inzuchtmausstamm
5,7-DHT	5,7-Dihydroxytryptamin
5,7-DHTP	5,7-Dihydroxytryptophan
5-HIAA	<i>5-hydroxy indole acetic acid</i>
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
6MPH4	6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin
7-HTP	7-Hydroxytryptophan
A	Ampere
AA	<i>arachidonic acid</i>
AAAD	Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase
AAAH	Aromatische-Aminosäure-Hydroxylase
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AD	Antidepressiva
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Österreich
BALB/c	ein Inzuchtmausstamm
BH4	Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
C-	carboxy-
C57BL/6	ein Inzuchtmausstamm
CA	Californien
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CDN	Kanada
Ci	Curie
Co-IP	Koimmunopräzipitation
COS7	<i>African Green Monkey SV-40 transfected kidney fibroblast cell line</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CT	Connecticut
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBA/2	ein Inzuchtmausstamm
DK	Dänemark
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	<i>desoxyribonuclease</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat

DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>electrogenerated chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FKS	fötales Kälberserum
FLAG	DYKDDDDK-Epitop
for	<i>forward</i>
FST	<i>forced swimming test</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
h...	<i>human</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney cell line</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
ICC	Immuncytochemie
IHC	Immunhistochemie
IL	Illinois
IP	Immunopräzipitation
Km	Michaelis-Menten-Konstante
KO	<i>knock-out</i>
LAAT	<i>large (neural) amino acid transporter</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	mol/l
m	Meter
m...	<i>mouse</i>
MA	Massachusetts
MAO-A/B	Monoaminoxidase A/B
MAT	<i>mating type</i>
MBP	Maltose bindendes Protein
MEM	<i>minimum essential medium</i>
min	Minuten
M-MLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Mississippi
MTP	Mikrotiterplatte
myc	EQKLISEEDL-Epitop
N-	amino-
NAT	Serotonin N-Acetyltransferase
NL	Niederlande
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NSD1015	3-Hydroxybenzylhydrazin
nt	Nukleotide
ODx	optische Dichte bei x nm
ORF	<i>open reading frame</i>

P815	Mastocytomazelllinie
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCA	<i>perchloric acid</i>
PCPA	p-Chlorophenylalanin
PEP	PEP-19 = <i>Purkinje cell protein 4</i> = PCP4
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>pyrococcus furiosus</i>
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PM	<i>elevated plus maze test</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRP	<i>platelet rich plasma</i>
r...	<i>rat</i>
rev	<i>reverse</i>
RML-RACE	<i>RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends</i>
RMT	Raumtemperatur
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	<i>ribonuclease</i>
RPA	<i>ribonuclease protection assay</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	<i>standard error of measurement</i>
SERT	Serotonintransporter
SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SUI	Schweiz
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamid
TG	Transglutaminase
TPH1/2	Tryptophanhydroxylase 1/2
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Trp	L-Tryptophan
TST	<i>tail suspension test</i>
TT	<i>thyroid medullary carcinoma cell line</i>
TUBB	Tubulin $\beta$ 2A
TX	Texas

u	<i>unit</i>
UK	United Kingdom
ÜS	Überstand
USA	United States of America
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
VMAT1/2	Vesikulärer Monoamintransporter1/2
V <sub>max</sub>	maximale Substratumsatzgeschwindigkeit
w/v	Verhältnis von Masse zu Volumen
WB	Westernblott
WI	Wisconsin
wt	Wildtyp
Y <sup>-</sup>	<i>yeast positive control</i>
Y <sup>+</sup>	<i>yeast negative control</i>
Y2H	<i>yeast two hybrid</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Serotonerge System

Das serotonerge System bildet zusammen mit dem noradrenergen und dopaminergen System das System der biogenen Monoamine. Es besteht aus Transportern (z.B. Transporter großer neutraler Aminosäuren (LAAT), Serotonintransporter (SERT)), Enzymen (z.B. Tryptophanhydroxylase (TPH), Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AAAD), Monoaminoxidase (MAO)), den von ihnen synthetisierten Tryptophanderivaten (z.B. Tryptophan (Trp), 5-Hydroxytryptophan (5-HTP), Serotonin (5-HT), Melatonin und den Rezeptoren dieser Amine (Serotoninrezeptoren).

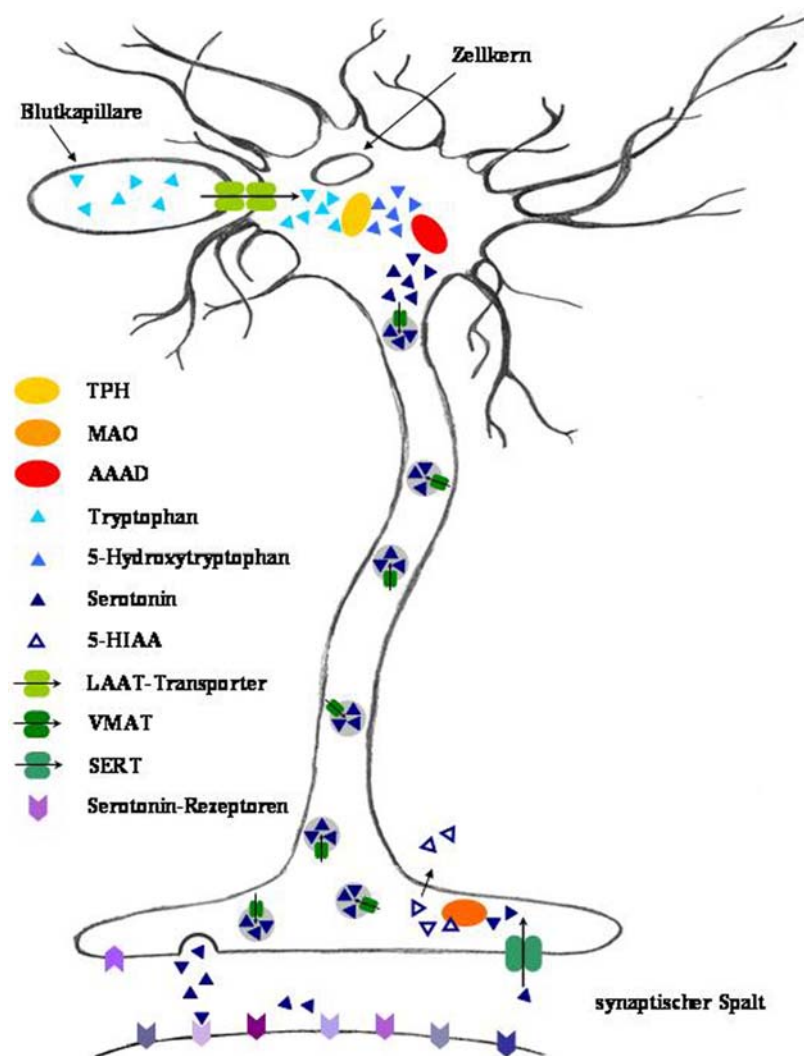
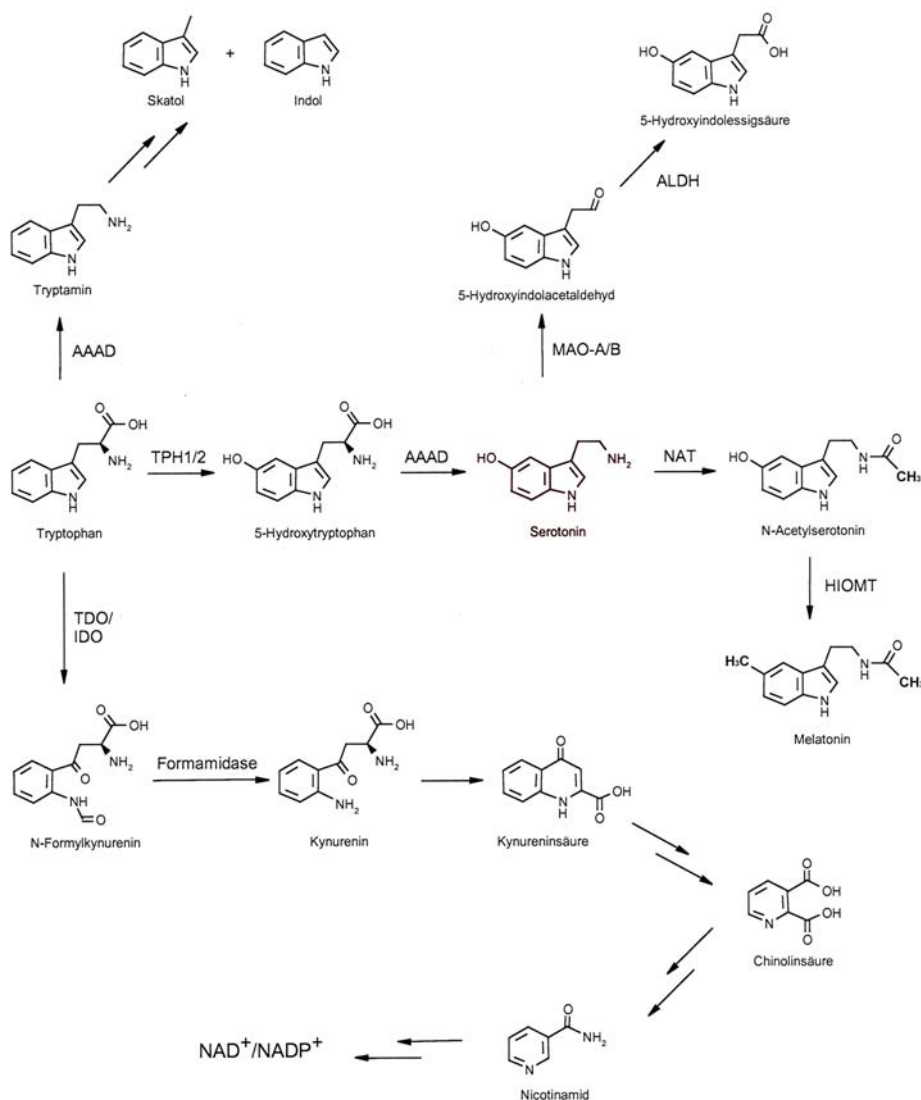


Abb. 1: Das serotonerge System in Neuronen.

Am Anfang der biochemischen Vorgänge im serotonergen System der Neuronen steht der durch den LAAT vermittelte Transport von Trp aus den Blutkapillaren in die Zellen. Dort wird das Tryptophan durch die TPH in 5-HTP umgewandelt. Dieses wiederum dient als Substrat

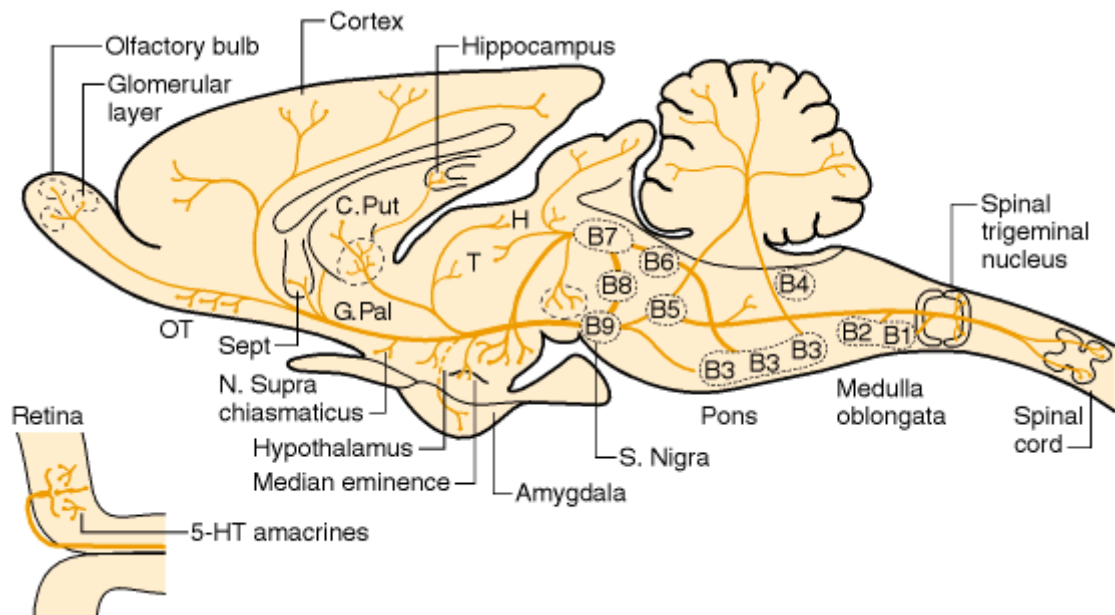
der AAAD, die es zu 5-HT umsetzt. Das 5-HT wird mittels VMAT in Vesikel aufgenommen, dort gespeichert und über den axonalen Transport zur Synapse befördert. Beim Eintreffen eines Aktionspotentials entleeren die Vesikel ihren Inhalt in den synaptischen Spalt. Dort entfaltet 5-HT seine Neurotransmitterwirkung über Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von 5-HT Rezeptoren. Ein Großteil des im synaptischen Spalt befindlichen 5-HT wird durch den SERT wieder in die Präsynapse zurücktransportiert (Reuptake). Ein Teil dieses wiederaufgenommenen 5-HT wird von der MAO zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) verstoffwechselt, der Rest wird wieder in Vesikel aufgenommen (Abb. 1). Die vom Tryptophan ausgehenden biochemischen Stoffwechselreaktionen sind in Abb. 2 zusammengefasst.



**Abb. 2: Biochemische Stoffwechselvorgänge im serotonergen System.**

Die Zellkörper der wenigen serotonergen Neuronen (~ 300.000 im menschlichen Hirn) des Gehirns ordnen sich in Form von 9 Gruppen (B1 – B9) nahe der Mittellinie des Hirnstammes innerhalb der sogenannten Raphe Nuclei an (Dahlstrom und Fuxe, 64). Einige der Zellkörper

serotonerger Neuronen befinden sich aber auch außerhalb der Raphe Nuclei und viele der Zellkörper innerhalb der Raphe Nuclei gehören nicht zu serotonergen Neuronen.



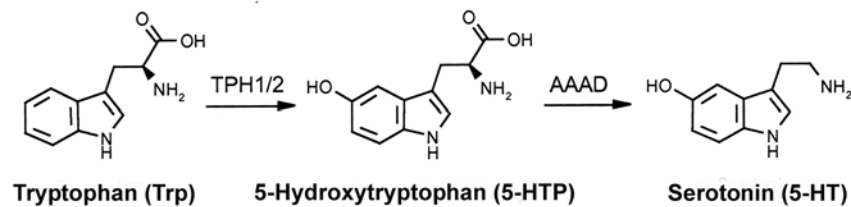
**Abb. 3: Serotonerge Projektionen im ZNS der Ratte.** Darstellung der Gruppen serotonerger Zellkörper (B1-B9) und ihrer Hauptprojektionen im sagittalen Schnitt des Ratten-ZNS. OT: Bulbus olfactorius; Sept: Septum; C.Put: Nucleus caudatus - Putamen; G.Pal: Globus pallidus; T: Thalamus; H: Habenulae; S.nigra: Substantia nigra; modifiziert nach (Consolazione und Cuello, 82).

Die Axone der vom Mittelhirn ausgehenden Nuclei projizieren hauptsächlich in Striatum, Motorcortex und Neocortex, Hippocampus, Septum, Hypothalamus, Amygdala und Substantia nigra. Die Nuclei in Pons und Medulla besitzen weniger Neuronen und projizieren in den Hirnstamm selbst, ins Kleinhirn und in drei absteigenden Bahnen ins Rückenmark. Außerdem sind die Raphekerne untereinander mit Axonen verbunden (Molliver, 87). Die massiven axonalen Projektionen der wenigen serotonergen Neuronen bilden das umfangreichste Neurotransmittersystem in ZNS (Abb. 3).

## 1.2 Monoamine des Serotonergen Systems

### 1.2.1 Serotonin (5-HT)

1948 konnte das Indolderivat 5-Hydroxytryptamine (5-HT), das auch unter der Bezeichnung Serotonin bekannt ist, erstmals isoliert und identifiziert werden (Rapport et al., 06; Rapport et al., 47; Rapport et al., 48). Bereits seit der Mitte des 19. Jahrhunderts war man sich der Existenz einer solchen Substanz im Blutserum bewusst, welche die glatte Gefäßmuskulatur kontrahiert und den Gefäßtonus reguliert. 5-HT ist die entscheidende, wirksame Komponente des serotonergen Systems. Es wird in 2 Schritten aus Trp synthetisiert (Abb. 4). Im ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieser Reaktion hydroxyliert die TPH das Trp zu 5-HTP. Im zweiten Schritt erfolgt eine Decarboxylierung des 5-HTP durch die AAAD zu 5-HT.



**Abb. 4: 5-HT-Biosynthese.**

#### 1.2.1.1 5-HT-Verteilung im Organismus

5-HT ist phylogenetisch betrachtet einer der ältesten Botenstoffe, der sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich weit verbreitet ist.

**Tab. 1: Organe und Gewebe, in denen 5-HT und TPH-mRNA bzw. Protein nachgewiesen wurde.**

Organ oder Gewebe	Zelltyp	Biomolekül	Quelle
Gehirn	Raphe-Neuronen	5-HT und TPH	(Weber und Horita, 65)
	Epiphyse	5-HT und TPH	
Auge	retinale Zellen	5-HT und TPH	(Green und Besharse, 94)
gastrointestinaler Trakt	enterochromaffine Zellen	5-HT und TPH	(Weber und Horita, 65)
	enterische Neuronen		
Nebennierenmark	adrenochromaffine Zellen	5-HT und TPH	(Delarue et al., 92)
Niere	renale proximale Tubuli	5-HT und TPH	(Sole et al., 86)
hämatopoetische Zellen	Thrombozyten	5-HT und TPH	(Champier et al., 97)
	Lymphozyten und Makrophagen	5-HT und TPH-mRNA	(Finocchiaro et al., 88)
	Mastzellen	5-HT und TPH	(Finocchiaro et al., 88)
Milz	T-Lymphozyten?	5-HT und TPH	(Young et al., 93)
Pankreas	β-Zellen der Langerhanschen	5-HT und TPH	(Barbosa et al., 98)
	Inselzellen		
Lunge	neuroendokrine Zellen	5-HT und TPH	(Newman et al., 93)
Hoden	Leydigzellen	5-HT	(Frungieri et al., 99)
Zunge	Geschmacksknospen	5-HT und TPH	(Fujimoto et al., 87)
Brustdrüse	Epithelzellen	5-HT und TPH	(Matsuda et al., 04)
Zygote		5-HT und TPH	(Walther und Bader, 99)
Blastozyste		5-HT und TPH	(Walther und Bader, 99)

Ein Großteil des 5-HT eines Säugetiers befindet sich in Vesikeln gespeichert in den enterochromaffinen Zellen der Magen- und Darmschleimhaut (Weber und Horita, 65). Aus diesen Zellen kann es an den Blutstrom abgegeben werden, wo es dann in großen Mengen von den Thrombozyten aufgenommen und gespeichert wird (Ormsbee, III und Fondacaro, 85). Auch in den Rapheneuronen des Hirnstamms und in der Epiphyse wurden hohe 5-HT-



Konzentrationen nachgewiesen (Weber und Horita, 65). Neben dem Darm, dem Hirn und den Thrombozyten gibt eine Vielzahl weiterer Zelltypen und Gewebe, die 5-HT enthalten (Tab. 1).

#### *1.2.1.2 Funktionen des 5-HT in Peripherie und ZNS*

Das Monoamin 5-HT ist in die Regulation vieler physiologischer Funktionen und Verhaltensweisen im Zentralnervensystem (ZNS) und in den peripheren Organen involviert. Seine Hauptfunktion ist die eines Neurotransmitters im Gehirn, wo es an der Regulation von Appetit, Sexualverhalten, Schlaf, Schmerz, emotionalem und impulsivem Verhalten und Aggressionen beteiligt ist (Jacobs und Azmitia, 92; Lucki, 98) und erstmals 1953 nachgewiesen werden konnte (TWAROG und PAGE, 53). Da 5-HT eine hydrophile Substanz ist, kann es die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren und muss deswegen im Hirn selbst synthetisiert werden. Es spielt bei der Entwicklung und Vernetzung der Neuronen eine wichtige Rolle (Gaspar et al., 03) und ist der Vorläufer des Epiphysenhormons Melatonin.

In der Peripherie kommt dem 5-HT eine Vielzahl von Aufgaben zu. Das in den Vesikeln der enterochromaffinen Zellen des Darms gespeicherte 5-HT bewirkt nach seiner Freisetzung ins Darmlumen eine Kontraktion der glatten Muskulatur und reguliert somit die Darmmotilität (Ormsbee, III und Fondacaro, 85). Das Serotonin der Thrombozyten wird bei der Blutgerinnung freigesetzt und spielt eine tragende Rolle bei der primären Hämostase (Holland, 76; Walther et al., 03b). In den Mastzellen vorkommendes 5-HT ist an der T-Zell-vermittelten Immunantwort beteiligt (Geba et al., 96). Da 5-HT auch in befruchteten Eizellen und embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden konnte, scheint es auch bei ontologisch frühen Stadien und damit vermutlich bei Entwicklungsprozessen eine Rolle zu spielen (Walther und Bader, 99). In der Epiphyse, die sich zwar im Gehirn befindet, aber durch die Blut-Hirn-Schranke von ihm getrennt ist, befindet sich die höchste Konzentration an 5-HT. Es dient hier hauptsächlich als Ausgangssubstanz für die Synthese des Botenstoffs Melatonin, der u.a. in die Kontrolle des zirkadianen Rhythmus verwickelt ist (Reiter, 93). In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl neuer Funktionen des 5-HT aufgedeckt. Es ist z.B. an der Homöostase des pH-Wertes in den Hirnkapillaren (Richerson, 04), der Leberregeneration (Lesurtel et al., 06) und der kardialen Regulation (Cote et al., 03) beteiligt.

#### **1.2.2 Tryptophan (Trp)**

Trp ist eine essentielle Aminosäure mit einer aromatisch, lipophilen Seitenkette, die dem Körper über die Nahrungsaufnahme zugeführt werden muss. Sie steht am Anfang der Synthesewege des serotonergen Systems und wird in zwei Reaktionen von TPH und AAAD in 5-HT umgewandelt. Das bei der Darmpassage ins Blutplasma aufgenommene Trp

konkurriert bei seinem Transport durch die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn mit den anderen großen, neutralen Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin). Zudem ist der  $K_m$ -Wert der TPH höher als die Tryptophankonzentration in Gehirn, wodurch unter physiologischen Bedingungen die TPH-Aktivität durch die Verfügbarkeit von Trp limitiert wird (Friedman et al., 72). Deswegen geht man auch von einem engen Zusammenhang zwischen Tryptophankonzentration und 5-HT-Syntheserate im Hirn aus. Tryptophan gilt als „natürliches Antidepressivum“ da ihm wird eine gute Wirksamkeit bei depressiven Erkrankungen bei gleichzeitig geringen Nebenwirkungen nachgesagt.

### 1.2.3 5-Hydroxytryptophan (5-HTP)

5-HTP ist das unmittelbare Vorgängermolekül von 5-HT. Es wird im geschwindigkeitbestimmenden Schritt der 5-HT-Synthese durch die TPH aus Trp synthetisiert und dann durch die AAAD in 5-HT umgewandelt. 5-HTP ist lediglich ein Reaktionsintermediat und übt keine eigenen Effekte aus. Es wurde in der Vergangenheit als Nahrungszusatz, der dann vom Körper als direktes Substrat für die 5-HT-Synthese genutzt werden kann, zur Behandlung von leichten Depressionen (Persson und Roos, 67; Angst et al., 77), zur Blutdrucksenkung und zur Linderung von Kopfschmerzen (Bono et al., 82) und Schlaflosigkeit (Wyatt et al., 71; Guilleminault et al., 73) eingesetzt. Es wird leicht vom Darm absorbiert (Magnussen und Nielsen-Kudsk, 80) und kann die Blut-Hirn-Schranke ohne die Zuhilfenahme eines spezifischen Transporters ungehindert passieren.

### 1.2.4 Melatonin

Melatonin, ein körpereigenes zirkadianes Hormon, wird von der Epiphyse produziert und sekretiert (Arendt, 95; Cote et al., 03). Seine Produktion unterliegt einem endogenen, in den suprachiasmatischen Nuclei produzierten Rhythmus. Die maximale Melatoninproduktion in den Pinealozyten findet in der Nacht statt, wenn über ein Signal von den Augen die Abwesenheit von Licht angezeigt wird. Die primäre Funktion des Melatonins ist die Transduktion von den Hell-Dunkel-Zyklus betreffenden Informationen an die Körperphysiologie zur Organisation des zirkadianen Rhythmus (Pevet et al., 02; Arendt, 95; Cote et al., 03). Die ebenfalls periodischen Expressionsschwankungen des melatoninproduzierenden Enzyms Serotonin-N-Acetyltransferase (NAT = geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Melatoninsynthese aus 5-HT) regulieren die zyklische Synthese des Melatonins (Tamarkin et al., 85). Melatonin wird nach seiner Produktion in der Epiphyse schnell in den Blutstrom abgegeben und diffundiert von dort aus auch in andere Körperflüssigkeiten (Tan et al., 99). Es kann alle morphophysiologischen Barrieren, wie die

Blut-Hirn-Schranke, ungehindert passieren und sich dadurch in allen Geweben verteilen (Oaknin-Bendahan et al., 95). Melatonin wird in der Leber metabolisiert. Dabei werden ca. 50-80 % des produzierten Melatonins in den Metaboliten 6-Sulfatoxymelatonin umgewandelt.

### **1.3 Enzyme des Serotonergen Systems**

#### **1.3.1 Tryptophanhydroxylasen**

##### *1.3.1.1 Die Familie der Aromatischen-Aminosäure-Hydroxylasen (AAAH)*

Die Tryptophanhydroxylasen gehören zusammen mit der Phenylalaninhydroxylase (PH) und der Tyrosinhydroxylase (TH) zur Superfamilie der pterin-abhängigen AAAHs. Jedes dieser Enzyme katalysiert unter Nutzung von molekularem Sauerstoff und dem Kosubstrat Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) die Hydroxylierung der aromatischen Seitenkette seines jeweiligen Aminosäuresubstrates. Die Hydroxylierung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan ist in vielzelligen Organismen für die korrekte Funktion des ZNS unerlässlich.

TPH und TH katalysieren die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Biosynthese monoaminerger Neurotransmitter, der Indolamine und Katecholamine. Dabei katalysiert die TH die Hydroxylierung von Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin und damit den erste Schritt der Synthese der Katecholamine Dopamin, Norepinephrin und Epinephrin. Das als Substrat für diese Reaktion dienende Tyrosin wird von der PAH durch die Hydroxylierung von Phenylalanin gebildet. Tyrosin wird aber auch mit der Nahrung aufgenommen. Die TPH katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Umwandlung von Trp zu 5-HTP.

##### *1.3.1.2 Entdeckung des zweiten TPH-Isozyms*

Seit mehr als 30 Jahren tauchten in der Literatur immer wieder Hinweise auf die Existenz eines zweiten TPH-Isozyms auf (Mockus und Vrana, 98; Cash, 98). Bei der Aufreinigung von TPH-Enzym aus Gesamthirnproben, die sowohl den Hirnstamm als auch die Epiphyse enthielten, wurden zwei Aktivitätspeaks mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten detektiert (Cash et al., 85). Für teilweise aufgereinigte Enzyme wurden, in Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe, verschiedenen biochemischen Eigenschaften beschrieben (Nakata und Fujisawa, 82b; Nakata und Fujisawa, 82a; Yang und Kaufman, 94; Kuhn et al., 80a). Die erste Generation von anti-TPH-Antikörpern, die aus der murinen Mastocytomazelllinie P815 aufgereinigt wurde, detektierte zwar die TPH aus Darmpräparaten, aber nicht die aus Hirnproben (Hasegawa et al., 87). Mit später entwickelte Antikörpern konnten ebenfalls

entweder Enzyme aus dem Hirn oder dem Darm oder aber Produkte unterschiedlicher Größe in beiden Geweben nachgewiesen werden (Chung et al., 01; Haycock et al., 02). Diese beobachteten Unstimmigkeiten wurden mit unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) der TPH in unterschiedlichen Geweben erklärt (Cash, 98; Hufton et al., 95).

Ein weiterer Hinweis auf die Existenz von verschiedenen TPH-Isoformen kam von dem unterschiedlichen mRNA-Protein Verhältnis in Epiphyse und Hirnstamm (Dumas et al., 89; Wang et al., 02; Hart et al., 91; Wang et al., 02; Austin und O'Donnell, 99). Zwar waren in beiden Hirnarealen die TPH-Proteinlevel gleich hoch, die Menge an TPH-mRNA war aber im Hirnstamm 150-mal geringer als in der Epiphyse. In Ermangelung anderer Erklärungen nahm man an, dass diese Divergenz auf einer ungleichen Translationseffizienz von in der 5'-UTR unterschiedlich gesplittenen mRNAs beruhte.

Zusätzliche Hinweise für die Existenz mehrerer *Tph*-Gene lieferten transgene Studien mit dem *Tph*-Promotor. Mehrere Gene wurden gewebspezifisch unter der Kontrolle des murinen *Tph*-Gens exprimiert (Huh et al., 94; Son et al., 96). Die höchste und in einigen Fällen auch die ausschließliche Expression des verwendeten *lacZ* Reportergens wurde in der Epiphyse detektiert (Huh et al., 94). Diese Feststellung sorgte für Verwirrung, da man auch im Hirnstamm, wo die TPH schließlich mehrfach mit Antikörpern nachgewiesen worden war, eine Expression des *Tph*-Promoter-gesteuerten Reportergens erwartet hätte. Eine Erklärung hierfür konnte allerdings nicht gefunden werden. Alle Versuche, die zur Identifizierung von TPH-Isozymen unternommen wurden, scheiterten am Fehlen differenzierender Antikörper oder Sonden.

Um die physiologische Bedeutung des Verlustes der 5-HT-Synthese zu untersuchen, wurde in unserem Labor eine TPH1-defiziente (TPH<sup>-/-</sup>) knock-out (KO) Maus generiert (Walther et al., 03a). Da die TPH das geschwindigkeitsbestimmende und erste Enzym auf dem Syntheseweg von Trp zu 5-HT ist, sollte deren Deletion einen kompletten Verlust von 5-HT im gesamten Organismus bewirken. Es war weiterhin zu erwarten, dass diese genetische Manipulation zu einem letalen Phänotyp führen würde, wie es beim Tyrosinhydroxylase KO der Fall war (Zhou et al., 95). Erstaunlicherweise konnten aber homozygote, lebensfähige TPH1-defiziente Mäuse generiert werden, die zudem keinen offensichtlichen pathologischen Phänotyp zeigten. Bei einer genauen Untersuchung der TPH<sup>-/-</sup> Mäuse stellte sich allerdings heraus, dass sie zwar kein 5-HT in der Peripherie, insbesondere im Darm, im Blut und in der Epiphyse besaßen, in den serotonergen Hirnregionen hingegen nur eine unwesentliche Reduktion der 5-HT-Level stattgefunden hatte (Abb. 5). Deswegen lag die Annahme der Existenz eines

zweiten, durch den KO nicht beeinflussten *Tph*-Gens nahe. Beim Durchsuchen der Human Genome Database konnte ein Homolog der *Tph1* - die *Tph2* - identifiziert werden. TPH2 cDNAs wurden aus Mensch, Ratte und Maus isoliert und eukaryotisch exprimiert. Die transfizierten Zellen gewannen dadurch die Fähigkeit zur Synthese von 5-HTP. Somit konnte die Funktionalität der TPH2 als echte Tryptophanhydroxylase nachgewiesen werden (Walther et al., 03a).

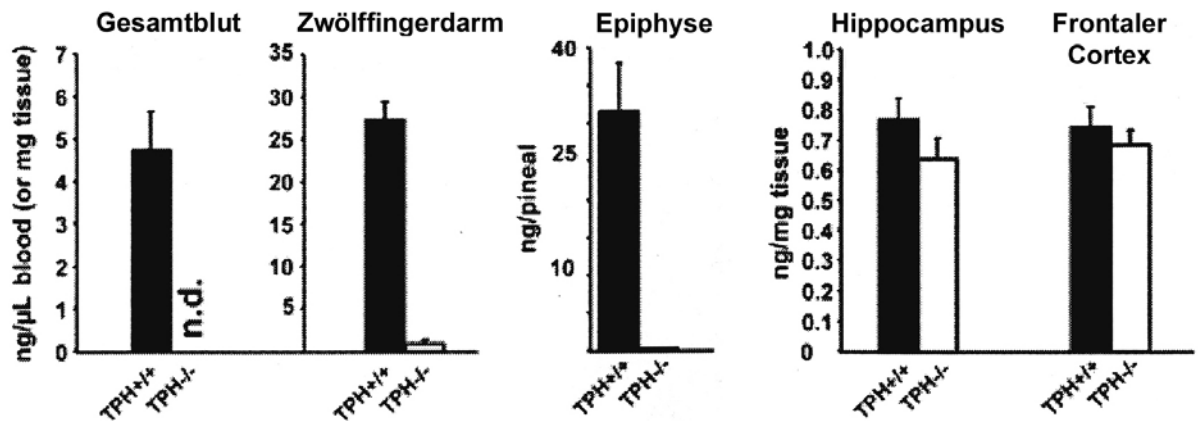


Abb. 5: 5-HT-Konzentration in der Peripherie (Gesamtblut, Zwölffingerdarm und Epiphyse) und in serotonergen Hirnregionen (Hippocampus und Frontaler Cortex) *Tph1*-defizienter Mäuse (TPH<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (TPH<sup>+/+</sup>) (Walther et al., 03a).

#### 1.3.1.3 Basale Daten zur TPH

Das *Tph1* Gen umfasst 10 codierende Exons, das *Tph2* Gen 11. Die TPH1- und 2-Proteine haben eine Größe von ca. 51 und 56 kDa (Tab. 2).

Tab. 2: Basale Daten zu TPH1 und 2 aus Mensch, Maus und Ratte.

TPH	EMBL UniProtKB	Chromosom	codierende Sequenz	Proteingröße	Exons
hTPH1	P17752 X52836	11	1335 bp	444 aa 51 kDa	10
hTPH2	Q8JWU9 AY098914	12	1473 bp	490 aa 56 kDa	11
mTPH1	P17532 J04758	7	1344 bp	447 aa 51 kDa	10
mTPH2	Q8CGV2 AY090565	10	1467 bp	488 aa 56 kDa	11
rTPH1	P09810 M28000	1	1335 bp	444 aa 51 kDa	10
rTPH2	Q8CGU9 AY098915	7	1458 bp	485 aa 56 kDa	11

Die TPH1 wird hauptsächlich in den enterochromaffinen Zellen der Darmwand und in der Epiphyse exprimiert, wohingegen der Expressionort der TPH2 die von den Raphekernen aus in alle Hirnbereiche projizierenden Neuronen sind (Walther et al., 03a). Eine Zusammenfassung der TPH-Expressionsorte ist in Tab. 1 dargestellt.

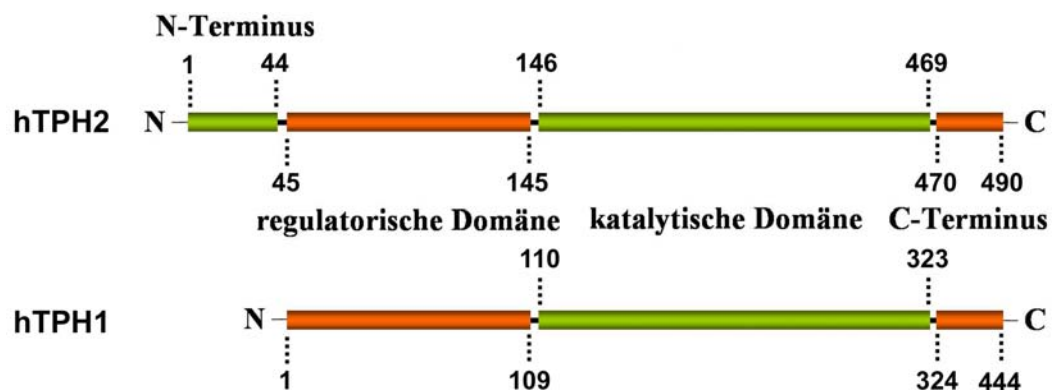
Die Aminosäuresequenzen von TPH1 bzw. 2 der Spezies Maus, Ratte und Mensch weisen im Speziesvergleich eine sehr große Homologie von 89 - 95 % auf. Auch der Vergleich der beiden Isozyme untereinander lässt eine starke Homologie von 66 - 70 % (je nach betrachteter Spezies) erkennen (Tab. 3.).

**Tab. 3: Aminosäuresequenzhomologien zwischen den TPH-Isozymen verschiedener Spezies.**

	<b>hTPH1</b>	<b>hTPH2</b>	<b>mTPH1</b>	<b>mTPH2</b>	<b>rTPH1</b>	<b>rTPH2</b>
<b>hTPH1</b>		70 %	89 %	70 %	91 %	70 %
<b>hTPH2</b>			66 %	92 %	68 %	94 %
<b>mTPH1</b>				66 %	95 %	67 %
<b>mTPH2</b>					68 %	95 %
<b>rTPH1</b>						68 %
<b>rTPH2</b>						

#### 1.3.1.4 Domänenstruktur der hTPH1

Die TPH1 kann, wie auch die anderen AAAs, in 3 Domänen unterteilt: die regulatorische, die katalytische und die C-terminale Tetramerisierungsdomäne (Daubner et al., 93; D'Sa et al., 96; Daubner et al., 97; Lohse und Fitzpatrick, 93; Dickson et al., 94). Bei der TPH2 existiert noch eine zusätzliche 4. Domäne mit bisher ungeklärter Funktion, die von den 44 N-terminalen Aminosäuren gebildet wird (Abb. 6).



**Abb. 6: Domänen der TPH1 und 2.**

Dank der Röntgenstrukturanalyse von PH, TH und der TPH1 selbst konnten diejenigen Aminosäuren identifiziert werden, die bei der TPH1 an der Bindung von Trp, des Kofaktors BH4 und von Fe<sup>2+</sup> beteiligt sind (Jiang et al., 00; Martinez et al., 01; McKinney et al., 01; Wang et al., 02). Aufgrund der Tatsache, dass TPH1 und TPH2 hochgradig homologe Enzyme mit einer 70 %igen Aminosäuresequenzübereinstimmung im Menschen sind (Tab. 3) und alle Aminosäuren, die bei der TPH1 nachweislich strukturelle und funktionelle Bedeutung haben, in der TPH2 konserviert sind (Abb. 7), sollten die meisten Eigenschaften der TPH1 auch bei der TPH2 zu finden sein.

hTPH1:	1	M-----IE-----	3
hTPH2:	1	M MQPAMMMFSSKYWARRGFSLDSAVPEEHQLLGSSTLNKPN SGK N	44
		<b>BH4</b> <b>hydrophobic interaction</b> <b>14-3-3</b> <b>CamKII/PKA</b>	
hTPH1:	4	DNKENKDHS-----LERGRASLIFSLKNEVGGLIKALFQEKHVNLLHIESRKSRRNS	58
		D+K NK S E G+ +++FSLKNEVGGL+KAL++FQEK VN++HIESRKS+RR+S	
hTPH2:	45	DDKGNKGSSKREATESGKTAVVFSLKNEVGGLVKALRLFQEKRVNMVHIESRKSRRRSS	104
		<b>3</b> <b>border</b>	
hTPH1:	59	EFEIFVDCDINREQLNDIFHLLKSHTNVLSVNLDPNFTLKEDGMETVPWFPPKISDL DHC	118
		E EIFVDC+ + + N++ LLK T +++N P+N +E+ +E VPWFP+KIS+LD C	
hTPH2:	105	EVEIFVDCECGKTEFNELIQLLKFQTTIVTLNPPENIWTEEELEDVPWFPRKISELDKC	164
		<b>BH4</b>	
hTPH1:	119	ANRVLMYGSELDADHPGFKDNVYRKRKYFADLAMNYKHGDIPIKVEFTEEEIKTWGTVF	178
		++RVLMYGSELDADHPGFKDNVYR+RRKYF D+AM YK+G PIP+VE+TEEE KTWG VF	
hTPH2:	165	SHRVLMYGSELDADHPGFKDNVYRQRRKYFVDVAMGYKYGPPIPRVEYTEEETKTWGVVF	224
		<b>BH4</b> <b>Trp</b>	
hTPH1:	179	QELNKLYPTHACREYLKNPLLSKYCYREDNIPQLEDVSNFLKERTGFSIRPVAGYLSP	238
		+EL+KLYPTHACREYLKN PLL+KYCYREDN+PQLEDVS FLKER+GF++RPVAGYLSP	
hTPH2:	225	RELSKLYPTHACREYLKNFPLLT KYCYREDNVQLEDVSMFLKERSGFTVRPVAGYLSP	284
		<b>BH4</b> <b>Trp</b> <b>Fe</b> <b>CamKII</b> <b>Fe</b> <b>Fe</b>	
hTPH1:	239	RDFLSGLAFRVFHTCYVVRHSSDPFYTPEDTCHELLGHVPLLAEP SFAQFSQEIGLASL	298
		RDFL+GLA+RVFHTCY+RH SDP YTPEPDTCHELLGHVPLLA+P FAQFSQEIGLASL	
hTPH2:	285	RDFLAGLAYRVFHTCYIRHGSPLYTPEDTCHELLGHVPLLA DPKFAQFSQEIGLASL	344
		<b>BH4</b> <b>Fe</b> <b>BH4</b> <b>Trp</b> <b>Trp</b> <b>Trp</b>	
hTPH1:	299	GASEEAVQKLATCYFFTVEFGLCKQDGLRVFGAGLLSSI ELKHALSGHAKVPFDPKI	358
		GAS+E VQKLATCYFFT+EFGLCKQ+GQLR +GAGLLSSI ELKHALS A VK FDPK	
hTPH2:	345	GASDEDVQKLATCYFFTIEFGLCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKACVKA FDPKT	404
hTPH1:	359	TCKQECLITTFQDVYFVSESFE DAKEMREFTKTIKRPFVGVKNPYTRSIQILKDTKSIT	418
		TC QECLITTFQ+ YFVSESFE+AKEKMR+P K+I RPF V +NPYT+SI+ILKDT+SI	
hTPH2:	405	TCLQECLITTFQEAYFVSESFEBAKEKMRDFAKSITRPFVSVYFNPYTQSIEILKDT RSIE	464
		<b>Leucine zipper</b>	
hTPH1:	419	SAMNELQHDL DVVSDALAKVSRKPSI	444
		+ + +L+ DL+ V DAL K+++ I	
hTPH2:	465	NVVQDLRSDLNTVCDALNKMNQYLGI	490

**Abb. 7: Vergleich der Aminosäuresequenzen von hTPH1 und hTPH2.** Trp, BH4, Fe: Bindungsstellen für das Substrat Trp, den natürlichen Cofaktor BH4 und Fe<sup>2+</sup> bei der TPH1; Leucine Zipper: tetramerisierungsvermittelnde, hydrophobe Aminosäuren der TPH1; CaMKII, PKA: Phosphorylierungsstellen für PKA und CaMKII bei der TPH1; 14-3-3: 14-3-3 Bindungsstelle bei der TPH1; orangefarbene Punkte: mögliche Phosphorylierungsstellen auf dem TPH2-N-Terminus; nach (Walther und Bader, 03).

### 1.3.1.5 Tetramerisierung der TPHs

Die TPH1 betreffende Daten dokumentieren, dass das Enzym *in vivo* als Tetramer vorliegt (Nakata und Fujisawa, 82a; McKinney et al., 05). Alle AAAHs besitzen eine 4,3 – hydrophobe  $\alpha$ -Helix am C-Terminus des Proteins, deren Vorhandensein für die Tetramerisierung essentiell ist (Mockus et al., 97). Diese Helix bildet eine coiled-coil Formation mit den Helices der anderen Untereinheiten aus und erlaubt somit die Tetramerisierung der AAAHs (Vrana et al., 94; Pellow et al., 85; Mockus et al., 97; Lohse und Fitzpatrick, 93; Goodwill et al., 97). Die hydrophoben, für die Ausbildung der 4,3 – hydrophoben  $\alpha$ -Helix verantwortlichen Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Valin) sind in TPH1 und 2 hochkonserviert (Abb. 8). Man bezeichnet den C-Terminus auch oft als Leucin Zipper tragende Tetramerisierungsdomäne der AAAHs. Die Tetramerisierung selbst ist allerdings für die enzymatische Aktivität der TPH1 nicht essentiell (Mockus et al., 97). Eine Deletion des TPH1-C-Terminus, die Sequenzen jenseits der Tetramerisierungsdomäne mit einschließt, kann aber in Abhängigkeit von der Deletionslänge die enzymatische Aktivität zum Erliegen bringen (Yang und Kaufman, 94) und deutet damit weitere, bis jetzt ungeklärte Funktionen der C-terminalen Sequenzen an.

<b>hTPH1</b>	420	A	M	N	E	L	Q	H	D	L	D	V	V	S	D	A	L	A	K	V	S	R	K	P	S	I	444
<b>mTPH1</b>	423	A	M	N	E	L	R	Y	D	L	D	V	I	S	D	A	L	A	R	V	T	R	W	P	S	V	447
<b>rTPH1</b>	420	A	M	N	E	L	R	H	D	L	D	V	V	N	D	A	L	A	R	V	S	R	W	P	S	V	444
<b>hTPH2</b>	466	V	V	Q	D	L	R	S	D	L	N	T	V	C	D	A	L	N	K	M	N	Q	Y	L	G	I	490
<b>mTPH2</b>	464	V	V	Q	D	L	R	S	D	L	N	T	V	C	D	A	L	N	K	M	N	Q	Y	L	G	I	488
<b>rTPH2</b>	461	V	V	Q	D	L	R	S	D	L	N	T	V	C	D	A	L	N	K	M	N	Q	Y	L	G	I	485

**Abb. 8: Alignment der C-Termini von TPH1 und 2 verschiedener Spezies.** rot: konservierte, an der Tetramerisierung der TPH1 beteiligte Leucinreste; orange: konservierte, an der Tetramerisierung der TPH1 beteiligte hydrophobe Aminosäuren.

Es existiert nur eine einzige Röntgenkristallstrukturanalyse für die hTPH1 (Wang et al., 02). Da diese aber anhand einer doppelten Deletionsmutante angefertigt wurde ( $\Delta$ N102 -  $\Delta$ C402), kann sie keine Aussagen über den N- und C-terminalen Teil und die Tetramerstruktur der TPH1 liefern. Für die TPH2 gibt es nur ein TPH1-basiertes computergeneriertes Modell, welches folglich die gleichen Schwachstellen wie auch das TPH1-Modell aufweist (Carkaci-Salli et al., 06).

### 1.3.1.6 Regulierung der TPH-Aktivität über Substratkontrolle

Die TPH steht unter der Kontrolle der Verfügbarkeit ihres Substrats Trp. Die intrazelluläre Trp-Konzentration wird hierbei durch die Auslastung des LAAT bestimmt, der für den Transport aller großen aromatischen Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin,



Tyrosin und Trp) aus dem Blut ins Zellinnere verantwortlich ist. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist der LAAT gesättigt. Somit hängt die Verfügbarkeit von Trp von ihrem Verhältnis zu den anderen großen neutralen Aminosäuren im Plasma ab (Voog und Eriksson, 92; Shulkin et al., 95). Der  $K_m$ -Werte der TPH1 liegt bei ca.  $\sim 25 \mu\text{M}$  Trp. Im Hirn herrscht aber lediglich eine Trp-Konzentration von  $10\text{-}30 \mu\text{M}$ , was dazu führt, dass die TPH1 *in vivo* nur zu etwa 50 % gesättigt ist. Eine höhere Verfügbarkeit von Trp, z.B. nach der Nahrungsaufnahme, resultiert also in einer erhöhten 5-HT-Synthese (Lovenberg und Victor, 74; Carlsson und Lindqvist, 72).

#### *1.3.1.7 Regulierung der TPH1-Aktivität durch Phosphorylierung*

Die Aktivität der TPH1 wird mittels Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) reguliert, wobei die Phosphorylierung zu durch CaMKII (Furukawa et al., 93; Hamon et al., 78; Kuhn et al., 78; Kuhn et al., 80c; Kuhn et al., 80b; Yamauchi und Fujisawa, 79b; Yamauchi und Fujisawa, 79a; Yamauchi et al., 81; Yamauchi und Fujisawa, 83) oder PKA (Garber und Makman, 87; Johansen et al., 96) zu einer Verdoppelung der TPH-Aktivität führen kann. Die Serin 58 und 260 konnten als Phosphorylierungsstellen der CaMKII (McKinney et al., 05; Jiang et al., 00) und das Serin 58 als Ziel der PKA (McKinney et al., 05; Kumer et al., 97; Kuhn et al., 97) identifiziert werden. Beide Positionen sind bei der TPH2 konserviert und entsprechen hier den Aminosäuren Ser104 und Ser306 (Abb. 7). Möglicherweise handelt es sich auch bei diesen Stellen um Phosphorylierungsziele.

Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung allein nicht für die beobachtete Aktivitätssteigerung verantwortlich ist, sondern dass die Bindung eines 14-3-3 Protein an das Phosphoserin 58 letztendlich zu der beobachteten Aktivitätserhöhung führt (Banik et al., 97; Furukawa et al., 93; Ichimura et al., 87; Ichimura et al., 88; Kuhn et al., 97). Dabei wird vermutet, dass die im unphosphorylierten Zustand instabile und wenig aktive TPH in einem ersten Schritt phosphoryliert und damit auch stabilisiert wird. Diese Phosphorylierung ermöglicht nun die Bindung eines 14-3-3 Proteins, welches zum einen die Dephosphorylierung durch zelleigene Phosphatasen verhindert und zum anderen die TPH-Aktivität erhöht (Banik et al., 97). 14-3-3 Proteine sind dimere, ubiquitär exprimierte Proteine, die ca. 1 % der gesamten Hirnproteinmasse ausmachen (Boston et al., 82).

Auf dem zusätzlichen, 44 Aminosäuren langen N-Terminus der TPH2 befinden sich 5 weitere, hochkonservierte, mögliche Phosphorylierungsstellen (Abb. 7). Inwiefern eine Phosphorylierung dieser Stellen die TPH-Aktivität beeinflusst und damit vielleicht die Unterschiede zur TPH1 erklären kann, bedarf einer Untersuchung.

### 1.3.2 Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AAAD)

Die AAAD katalysiert die Decarboxylierung einer Reihe von aromatischen Aminosäuren und deren  $\alpha$ -methylierten Derivaten im Katecholamin- und 5-HT-Syntheseweg. Sie katalysiert z.B. die Umwandlung von L-DOPA zu Dopamin und von 5-HTP zu 5-HT (Bowsher und Henry, 86; BRODIE et al., 62). Es wird angenommen, dass die AAAD auch in die Synthese von Tryptamine aus Tyrosin, 2-Phenylethylamin aus Phenylalanin und Tryptamine aus Tryptophan verwickelt ist (Juorio und Boulton, 82; Jaeger et al., 84; Dyck et al., 83). Die AAAD wurde nicht nur in monoaminen Neuronen, sondern auch in anderen Neuronen und Geweben, wie Nebennieren, Niere und Leber nachgewiesen (Sourkes, 79; Voltattorni et al., 87), wo sie vermutlich noch an anderen Synthesewegen beteiligt ist (Kitahama et al., 88; Jaeger et al., 84; Eaton et al., 93; Skagerberg et al., 88).

### 1.3.3 Serotonin-N-Acetyltransferase (NAT)

Das cytoplasmatische Enzym NAT katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Melatoninsynthese aus 5-HT. Genau wie auch die Melatoninlevel schwanken die NAT-Level innerhalb eines Tages, wobei die Nachtlevel höher sind als die Taglevel (Klein und Weller, 70; Roseboom et al., 96; Klein et al., 97). Das zweite Enzym der Melatoninsynthese, die Hydroxyindol-O-Methyltransferase zeigt hingegen keine tageszeitbedingten Expressionveränderungen (Roseboom et al., 96; Klein et al., 97). Die täglichen periodischen Melatoninschwankungen sind also durch Schwankungen in der NAT-Expression bedingt.

### 1.3.4 Monoaminoxidase (MAO)

Die Monoaminoxidasen katalysieren die oxidative Deaminierung von primären, sekundären und tertiären Aminen. Sie sind für den Abbau des nach der Signalübertragung wieder aus dem synaptischen Spalt in die Präsynapse aufgenommenen 5-HT zu 5-HIAA verantwortlich. Es existieren 2 MAO-Isoformen: die MAO-A und die MAO-B. Die Isoformen unterscheiden sich in Substrat- und Inhibitorspezifität, sowie in ihrer Lokalisation. Die MAO-A metabolisiert Noradrenalin und 5-HT, wohingegen die MAO-B Benzamidin als Substrat bevorzugt (Johnston, 68). Tyramin und Dopamin werden von beiden Isoformen gleich gut metabolisiert (Johnston, 68). Die Verteilung von MAO-A und B im Hirn weist ebenfalls Unterschiede auf (Collins et al., 70).

### 1.3.5 Transglutaminase (TG)

TGs katalysieren die Ausbildung von Isopeptidbindungen zwischen  $\gamma$ -Carboxamidgruppen von proteingebundenen Glutaminresten und  $\epsilon$ -Aminogruppen von proteingebundenen Lysinresten, so dass die Reaktion zur Bildung von stabilen, unlöslichen makromolekularen Komplexen führt. Zusätzlich katalysieren TGs eine Reihe von Reaktionen, die zur kovalenten Verknüpfung von einfachen primären Aminen wie 5-HT an spezifische Glutaminreste der Substrate führen. Die Modifikation eines Proteins durch eine Transglutaminase stattet also das Substratprotein mit neuen Eigenschaften aus und ändert somit seine Funktion. Die TGs werden von einer Familie von strukturell und funktionell verwandten Genen kodiert. Bis heute sind 9 *Tg* Gene identifiziert, von denen 8 aktive Enzyme kodieren (Grenard et al., 01). Sechs TG Enzyme wurden isoliert und auf der Proteinebene analysiert (Tab. 4).

**Tab. 4: Transglutaminasen.**

Name	Synonym	kDa	Gewebe	Lokalisation
<b>TG1</b>	TGK, Keratinozyten-TG, Typ 1 TG	90	Epithelien	zytosolisch, Membran
<b>TG2</b>	TGC, tissue TG, Typ 2 TG	80	ubiquitär	zytosolisch, Nucleus, extrazellulär
<b>TG3</b>	TGE, epidermale TG, Typ 3 TG	77	Epithelien	zytosolisch
<b>TG4</b>	TGP, prostate TG, Typ 4 TG	77	Prostata?	extrazellulär
<b>TG5</b>	TGX, Typ 5 TG	81	Epithelien	zytosolisch
<b>TG6</b>	TGY, Typ 6 TG	unbekannt	unbekannt	unbekannt
<b>TG7</b>	TGZ, Typ 7 TG	80	ubiquitär	unbekannt
<b>FXIII</b>	FaktorXIIIA, Plasma TG, Fibrin stabilisierender Faktor	83	Blutplasma, Thrombozyten	extrazellulär
<b>Bande 4.2</b>	Erythrozyten Proteinbande 4.2	77	Erythrozyten	Membran

5-HT kann mit Hilfe von Transglutaminasen z.B. an kleine GTPasen transamidiert werden, die hierdurch konstitutiv aktiv werden. Dies geschieht z.B. während der Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten und stellt einen rezeptorunabhängigen intrazellulären Signalweg des 5-HT dar. Den Vorgang der Transamidierung von 5-HT an ein Substrat durch TGs bezeichnet man auch als Serotonylierung (Walther et al., 03b).

## 1.4 Transporter des Serotonergen Systems

Das erste Hindernis des 5-HT-Vorgängers Trp auf dem Weg vom Blut zu den Neuronen ist die Blut-Hirn-Schranke. Sie ist eine Besonderheit des Kapillarnetzes des Gehirns, und wird von den Endothelzellen der Gefäße gebildet, die hier durch sehr viele Tight-junctions eng

miteinander verbunden und von Gliazellen umgeben sind. Im Hirnbereich ist deshalb die Passage von Molekülen aus den Gefäßen in die extrazelluläre Flüssigkeit und die Zellen gegenüber dem Gefäßsystem des restlichen Körpers deutlich eingeschränkt. Ein Großteil des Molekülaustauschs zwischen dem Blut und der extrazellulären Flüssigkeit des Hirns geschieht auf transzellulärem Wege. Lediglich kleine Gasmoleküle und kleine lipophile Moleküle können einfach durch die Lipidmembranen der Endothelzellen diffundieren. Größere und hydrophile Moleküle sind auf einen aktiven und damit selektiven Transport angewiesen. Die spezifischen Transportsysteme der luminalen und abluminalen Membranen regulieren den transzellulären Austausch von hydrophilen Molekülen. Damit bilden sie eine selektive „Transportbarriere“, welche die Aufnahme benötigter Nährstoffe ermöglicht und potentiell schädliche Substanzen ausschließen bzw. hinausbefördern kann (Abbott et al., 06).

#### 1.4.1 Transporter für große neutrale Aminosäuren (LAAT)

Der Transport der großen neutralen Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Tyrosin, Phenylalanin und Trp aus den Gefäßen in den extrazellulären Raum und die Zellen erfolgt über den  $\text{Na}^+$  - abhängigen LAAT. Er befindet sich in den Membranen der Endothelzellen (Leathwood, 87; Salter et al., 89; O'Kane et al., 04). Unter normalen physiologischen Bedingungen ist der LAAT gesättigt. Somit hängt die Verfügbarkeit einer Aminosäure (z.B. Trp) im Hirn von ihrem Verhältnis zu den anderen großen neutralen Aminosäuren im Plasma ab (Voog und Eriksson, 92; Shulkin et al., 95).

#### 1.4.2 Vesikulärer Monoamintransporter (VMAT)

Das Trp wird im Zellinneren durch die TPH und die AAAD in 5-HTP und 5-HT umgewandelt. Das 5-HT und andere Monoamine werden in Vesikel aufgenommen und dort gespeichert. Die Aufnahme des 5-HT in die Vesikel erfolgt nach dem Prinzip des protonengetriebenen Antiports durch den VMAT. Eine ATP-abhängige Protonenpumpe erhält den Protonengradienten aufrecht, der die für den Aminosäuretransport notwendige Energie liefert (Abb. 9a). Die Vesikel werden letztendlich durch einen spannungsabhängigen Calciuminflux infolge eines ankommenden Aktionspotentials in den synaptischen Spalt entleert, wo 5-HT spezifisch an die jeweiligen Rezeptoren bindet.

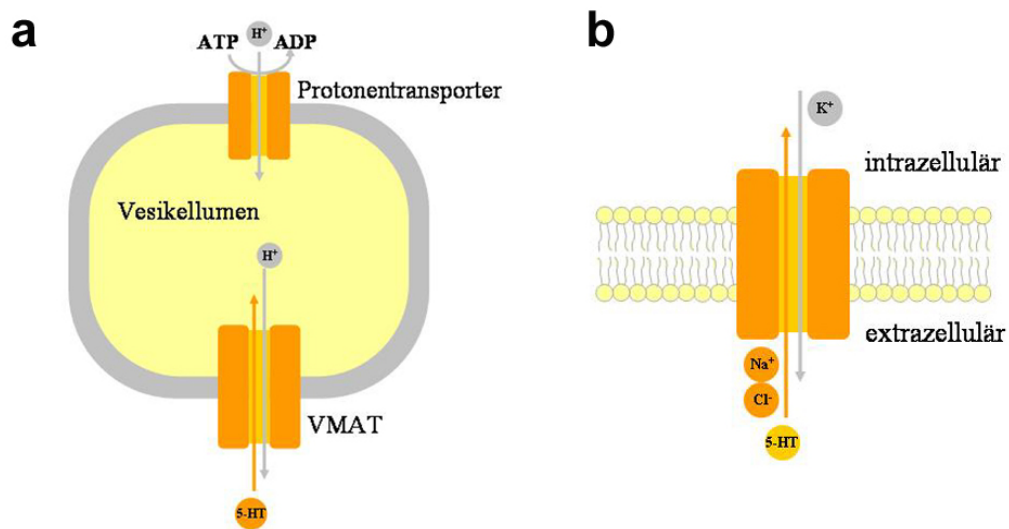


Abb. 9: VMAT (a) und SERT (b).

### 1.4.3 Serotonintransporter (SERT)

Bei der Signaltransduktion spielt der hochaffine plasmamembranständige SERT eine wesentliche Rolle. Er bestimmt die Dauer und Stärke der Transmission des Signals, indem er das in den synaptischen Spalt entleerte 5-HT zusammen mit Chlorid- und Natriumionen zurück ins Zytosol der präsynaptischen Zelle transportiert und somit die Signaltransmission beendet (Abb. 9b). Das rückgeführte 5-HT wird nun durch das Enzym MAO-A metabolisiert oder wieder in Vesikel verpackt. Der SERT kann aber auch überschüssiges 5-HT zusammen mit Kaliumionen aus Zelle heraustransportieren. Er wird nicht nur in Neuronen, sondern auch in 5-HT produzierenden peripheren Geweben exprimiert. Eine besondere Funktion kommt ihm in den Thrombozyten zu, die 5-HT nicht selbst produzieren, aber einen Großteil des Gesamt-5-HT des Körpers enthalten. Es wird während der Darmpassage durch SERT Aktivität aus dem Blut aufgenommen. Der SERT ist einer der bevorzugten Angriffspunkte zahlreicher antidepressiv wirkender Psychopharmaka, wie selektiver 5-HT-Wiederaufnahmeinhibitoren (SSRIs) und trizyklischer Antidepressiva.

## 1.5 Rezeptoren des Serotonergen Systems

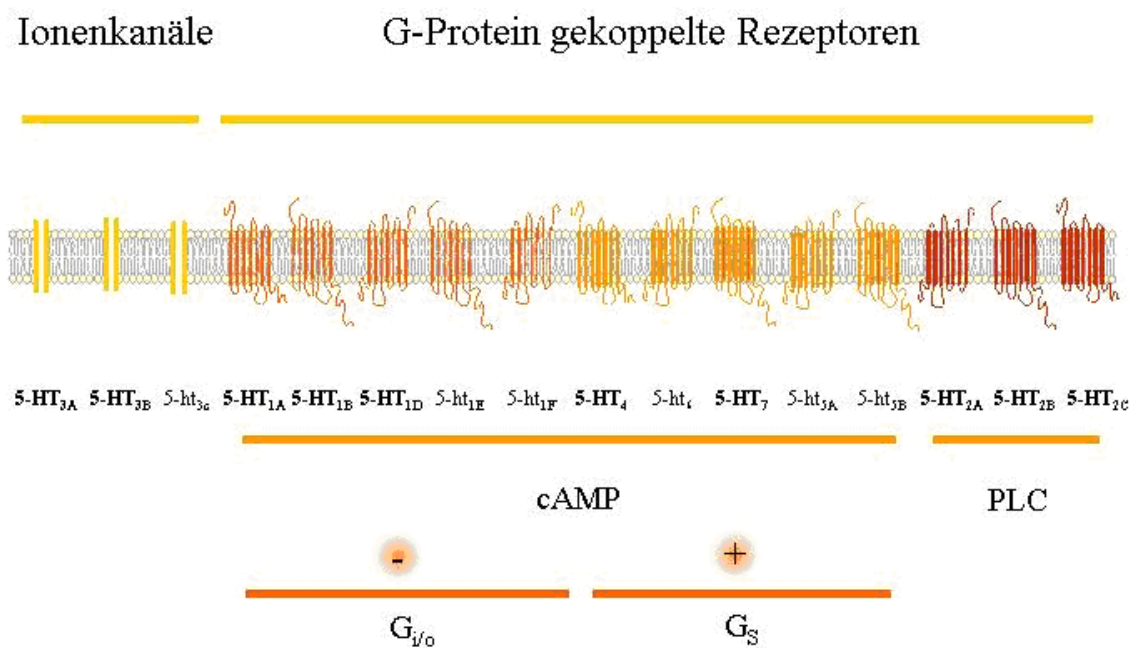
Die vielfältigen Wirkungen des 5-HT werden durch die große Familie der membrangebundenen 5-HT-Rezeptoren vermittelt. Diese Rezeptoren befinden sich, wie auch 5-HT, sowohl im zentralen und peripheren Nervensystem, als auch in nichtneuronalen Geweben wie Darm, kardiovaskulärem System und Blut. Aus der Vielzahl der Rezeptoren ergibt sich die Vielzahl der durch 5-HT vermittelten Prozesse. Insgesamt sind 16 5-HT-Rezeptoren bekannt (Tab. 5). Die Funktion von 6 dieser Rezeptoren wurde allerdings noch nicht in nativen Systemen nachgewiesen.

**Tab. 5: Funktion und Lokalisation von 5-HT-Rezeptoren.**

<b>Rezeptor</b>	<b>Verteilung</b>	<b>Physiologische Rolle</b>
5-HT <sub>1A</sub>	ZNS (Raphe nuclei, Hippocampus, Amygdala, Septum, Entorhinalcortex, Hypothalamus), Darm (myenterischer Plexus), Milz	Autorezeptor (inhibiert Neurotransmission) Agonist: wirkt hypotensiv, antidepressiv, anxiolytisch, senkt Herzfrequenz
5-HT <sub>1B</sub>	ZNS, Vaskulatur	terminaler Autorezeptor (präsynaptische Autoinhibition), vermittelt Proliferation Agonist: inhibiert Plasmavasion, gegen Migräne
5-HT <sub>1D</sub>	ZNS (Substantia nigra, Basalganglien, superior Colliculus), Herz	Autorezeptor Agonist: wirkt gegen Migräne
5-HT <sub>1E</sub>	ZNS (Frontalcortex)	unbekannt
5-HT <sub>1F</sub>	ZNS (Cortex, Hippocampus, Striatum, Gyrus dentatus, Nucleus taktus solitarius, Bulbus olfactorius, Rückenmark), Uterus	Autorezeptor Agonist: wirkt gegen Migräne
5-HT <sub>2A</sub>	ZNS (Cortex, Claustrum, Striatum, Nucleus accumbens), glatte Muskulatur, Thrombozyten	kontrahiert Blutgefäße, Harnwege, Darm, Uterus, erhöht Kapillarpermeabilität, vermittelt Thrombozytenaggregation
5-HT <sub>2B</sub>	ZNS (Cerebellum, Cortex, Amigdala, Caudate, Substantia nigra, Hypothalamus, Thalamus, Retina), Darm, Herz, Niere, Lunge, Vaskulatur, Endothelzellen von Lungenarterien	kontrahiert glatte Muskulatur, Vasorelaxation über NO-Freisetzung
5-HT <sub>2C</sub>	ZNS (Plexus choroidei, Globus pallidus, Cotex, Hypothalamus, Septum, Substantia nigra, Rückenmark)	Agonist: wirkt anxiolytisch
5-HT <sub>3A</sub>	ZNS (Hippocampus, Entorhinalcortex, Nucleus accumbens, Nucleus motorius dorsalis, Amygdala,	Ionenkanaluntereinheiten, bewirkt schnelle Depolarisation durch Na <sup>+</sup> - und K <sup>+</sup> -Influx,
5-HT <sub>3B</sub>	Area postrema, Nucleus taktus solitarius,	Darmmotilität, intestinale Sekretion
5-HT <sub>3C</sub>	Rückenmark), periphere autonome und sensorische Neuronen	
5-HT <sub>4</sub>	ZNS (Hippocampus, Striatum, Substantia nigra, Pre-Bötzing-Komplex), Darm, Blase, Nebenniere, Herz	verstärkt Neurotransmission und Gedächtnisbildung durch erhöhte Transmitterfreisetzung, kontrahiert Darm und Oesophagus durch ACh-Freisetzung, vermittelt Sekretion ins Darmlumen, kontrolliert Atmung Agonist: gastropromotorisch, verstärkt Herzkontraktion (Atrien)
5-HT <sub>5A</sub>	ZNS (Cortex, Cerebellum, Septum, Corpus callosum, Hypothalamus, Hippocampus, Fimbria; cerebrale Ventrikel, Riechkolben, Nucleus raphe dorsalis, Gliazellen)	Einfluss auf adaptives Verhalten bei Stress
5-HT <sub>5B</sub>		
5-HT <sub>6</sub>	ZNS (Striatum, Amygdala, Nucleus accumbens, Hippocampus, Cortex)	Einfluss auf Verhalten und Lernen Antagonist: erhöht ACh-Neurotransmission
5-HT <sub>7</sub>	ZNS (Cortex, Septum, Hypothalamus, Thalamus, Amygdala, superior Colliculus), glatte Muskulatur	Vasodilatation

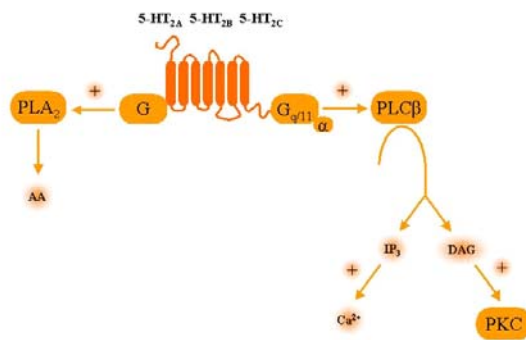
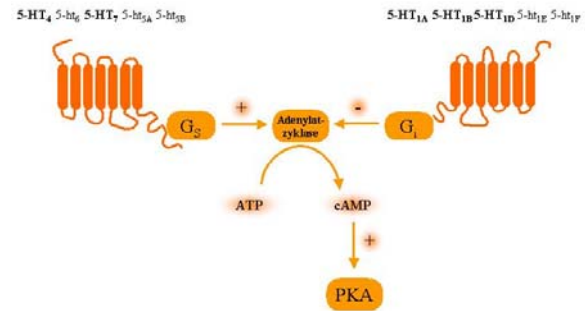
Die 5-HT-Rezeptoren werden zum einen alle in unterschiedlichen Bereichen des zentralen ZNS exprimiert. Zum anderen sind einige der Rezeptoren auch in peripheren Organen wie z.B. Milz, glatter Muskulatur, Herz, Niere, Blase und Darm zu finden (Tab. 5).

Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz, Genorganisation, pharmakologischen Eigenschaften und Effektormechanismen lassen sich die 5-HT-Rezeptoren sieben Familien zuordnen (Barnes und Sharp, 99). Sechs dieser Familien gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die siebente Familie zählt zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen (Hoyer et al., 94; Hoyer und Martin, 97; Humphrey et al., 93) (Abb. 10).



**Abb. 10: 5-HT-Rezeptoren.** Noch nicht in nativen Systemen nachgewiesene Rezeptoren sind in Kleinbuchstaben abgebildet.

Durch posttranslationale Modifizierung (Phosphorylierung und Glykosylierung), entwicklungs- und gewebsspezifisches mRNA-Editing (5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor) und Splicing (5-HT<sub>4</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor) sowie Homo- und Heterodimerisierung (5-HT<sub>1B/1D</sub>-Rezeptor) erhöht sich die Anzahl der unterschiedlichen Rezeptoren zusätzlich (Hoyer et al., 02). Die G-Protein-gekoppelten 5-HT-Rezeptoren besitzen die für diese Rezeptorsuperfamilie typische 7-Transmembrandomänenstruktur. Einige dieser Rezeptoren sind an stimulierende G-Proteine (G<sub>s</sub>; 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>) oder inhibierende G-Proteine (G<sub>i</sub>; 5-HT<sub>1</sub>) gekoppelt (Abb. 11a). Eine Ligandenbindung führt somit zur Aktivierung bzw. Hemmung der Adenylatzyklase, was wiederum zur Stimulierung/Inhibierung der Proteinkinase A führt. Die 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren hingegen sind an G<sub>q</sub>-Proteine gekoppelt (Abb. 11b) und damit Teil des Phospholipase C (PLC) Signalwegs, der letztlich zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führt (Raymond et al., 01).

**a****b**

**Abb. 11: 5-HT-Signalkaskaden über PKA (a) und PKC (b).** PKC: Proteinkinase C; PKA: Proteinkinase A; PLC: Phospholipase C; PLA: Phospholipase A; AA: Arachidonsäure.

## 1.6 Pathologie des serotonergen Systems

Durch die Entdeckung der zwei Isozyme TPH1 und TPH2 und die Aufklärung derer Expressionsmuster kann davon ausgegangen werden, dass die auf einen Defekt der Tryptophanhydroxylasen beruhenden Störungen des serotonergen Systems in der Peripherie auf Veränderungen der TPH1 und Störungen im ZNS auf Veränderungen der TPH2 beruhen.

### 1.6.1 Pathologie des peripheren serotonergen Systems

Eine der häufigsten, das periphere serotonerge System betreffenden Erkrankung ist das Reizdarmsyndrom. Die exakten Ursachen für diese Erkrankung sind zwar noch nicht bekannt, es wird aber vermutet, dass eine Störung in der Kommunikation zwischen dem enterischen Nervensystem des Darms und dem ZNS vorliegt (Mach, 04). Eine entscheidene Rolle kommt hierbei den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren zu, die sich auf enterochromaffinen Zellen und intrinsischen Nervenfasern befinden und durch endogenes 5-HT überstimuliert werden. 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor Antagonisten besitzen eine antiemetische Wirkung und werden deswegen als Therapeutikum gegen Übelkeit und Erbrechen eingesetzt. Agonisten der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren, die auf der glatten Darmmuskulatur und den Mucosazellen lokalisiert sind, wirken durch die Beeinflussung der Peristaltik und die Förderung der Wasser- und Elektrolytsekretion in den Darm und verringern die viszerale Schmerzempfindlichkeit (Schikowski et al., 02; Borman und Burleigh, 93; Hansen, 95).

Auch bei der Präeklampsie, einer Multiorganerkrankung, die von Hypertonie begleitet wird und im letzten Drittel der Schwangerschaft auftreten und letal verlaufen kann, wird eine Dysfunktion des serotonergen Systems vermutet. Hierbei scheinen erhöhte 5-HT-Plasmaspiegel, die durch eine Veränderung im 5-HT-Stoffwechsel bedingt sind, eine essentielle Rolle zu spielen (Carrasco et al., 00b; Weiner, 87). Es konnte gezeigt werden, dass



eine Vasokonstriktion in den Gefäßen der Plazenta vor allem durch eine reduzierte plazentale MAO-A-Aktivität, den daraus resultierenden verminderten 5-HT-Abbau und die dadurch bedingten erhöhten 5-HT-Level hervorgerufen wird (Carrasco et al., 00a). Aber auch eine verminderte Aktivität der tryptophanmetabolisierenden Indolaminoxidase (IDO) in den Endothelzellen der Plazenta, die zu einer lokalen Erhöhung des Trp-Spiegels und somit zu einer Verstärkung der 5-HT-Synthese führen kann, wurde beobachtet (Santoso et al., 02).

Auch bei bestimmten Krebserkrankungen spielt 5-HT eine wichtige Rolle. Es ist z.B. in das Krankheitsbild des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) und anderer Karzinoide (neuroendokrine Tumore, die aus enterochromaffinen Zellen hervorgehen und hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt, im Pankreas und in der Lunge vorkommen) verwickelt. Tumore dieser Art produzieren große Mengen 5-HT und verursachen das sogenannte Karzinoidsyndrom, das sich in Form von Diarrhöe und Hautrötung äußert. Der aus dieser hohen 5-HT-Syntheserate resultierende Mangel an Trp führt wiederum zu einem Nicotinamidmangel und äußert sich in Form von Pellagra ähnlichen Symptomen (Harris und Smith, 83). Sowohl bei humanem kleinzelligen Lungenkrebs (Cattaneo et al., 93b), als auch bei Karzinomen der Lunge (Hegedus et al., 87) und des Pankreas (Ishizuka et al., 92) wurde eine mitogene, also eine das Wachstum autokrin stimulierende Wirkung des 5-HT gezeigt.

### 1.6.2 Pathologie des neuronalen serotonergen Systems

Aufgrund der großen Bedeutung des serotonergen Systems innerhalb des ZNS wird auch eine Vielzahl neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen, wie z.B. Depressionen, Angststörungen, Essstörungen, gewalttätiges Verhalten, Alkoholismus, Aufmerksamkeitsdefizitssyndrom (ADHD), chronisches Schmerzsyndrom (Murphy et al., 86), mit serotonergen Dysfunktionen in Verbindung gebracht. .

Depressive Erkrankungen gehören zu den am weitesten verbreiteten Formen der mentalen Erkrankungen (Nestler et al., 02). Schwere Formen der Depression betreffen 2 % - 5 % der US amerikanischen Bevölkerung und ganze 20 % leiden unter milderer Ausprägungen dieser Erkrankung. Dabei sind Frauen in etwa doppelt so häufig von Depressionen betroffen wie Männer. Die ersten, eher zufällig entdeckten Medikamente mit antidepressiver Wirkung waren Substanzen, welche das monoaminerge System beeinflussten. Seit der Entdeckung des antidepressiven Einflusses dieser Substanzen wurden Depressionen als eine Störung der serotonergen, noradrenergen und dopaminergen Neurotransmission angesehen. Die auf diesen Erkenntnissen basierende Theorie wird als Monoaminhypothese der Depression (Prange, Jr., 64; Lapin und Oxenkrug, 69) bezeichnet. Sie setzt sich aus verschiedenen kleinen

Theorien zusammen, die aber alle Defizite in den verschiedenen biogenen Monoaminsystemen als Ursache für die Entstehung von depressiven Erkrankungen benennen. Die wichtigsten dieser Teiltheorien sind die Serotonin-, (Coppen und Doogan, 88; Coppen, 67) die Noradrenalin- (Schildkraut, 65), die cholinerg-adrenerge Gleichgewichts- (Fritze und Beckmann, 88; Janowsky et al., 72) und die Dopamin-Hypothese (Birkmayer und Riederer, 75). Sie beruhen im Wesentlichen auf Erkenntnissen aus den biochemischen und pharmakologischen Wirkungen psychotroper Substanzen (Riederer et al., 85; Beckmann, 83; Beckmann, 78).

Die ersten, auf eine Beteiligung des serotonergen Systems hinweisenden Daten stammen aus den 1960er Jahren und zeigen, dass Depressionen und Suizidverhalten oft mit einem niedrigen 5-HT-Spiegel assoziiert sind. Versuche mit Antidepressiva wie MAO- und SERT-Hemmern, die beide die serotonerge Neurotransmission erhöhen, indem sie den 5-HT-Abbau bzw. die Wiederaufnahme von 5-HT aus dem synaptischen Spalt hemmen, unterstützen die 5-HT-basierte Monoaminhypothese (DEWHURST und PARE, 61; Akiskal und McKinney, Jr., 73; Lesch und Beckmann, 90; Rosa-Neto et al., 04).

Die monoaminerge Defizienz kann nach der Monoamin-Hypothese durch verschiedene Mechanismen bewirkt werden. Betrachtet man das serotonerge System im Speziellen, dann gibt es eine Vielzahl von Komponenten, die potentiell einen Defekt bei Menschen mit Depressionen aufweisen können oder durch Therapiemaßnahmen beeinflussbar sind (Murphy et al., 86). Dazu gehören:

- Tryptophan (Konzentration in Plasma und Gehirn, Transport)
- Tryptophanhydroxylaseaktivität
- Aminosäuredecarboxylaseaktivität
- Serotonin (Speicherung, Freisetzung, „Reuptake“-Mechanismus)
- Monoaminoxidaseaktivität
- Serotoninrezeptoren
- postrezeptorische Effektorsysteme/Transduktionswege.

Zur Behandlung von Depressionen werden stimmungsaufhellende Medikamente (Antidepressiva; AD) eingesetzt. In Abhängigkeit vom Wirkstoff haben die Antidepressiva auch noch angstlösende, beruhigende, antriebssteigernde oder antriebsdämpfende Effekte. Die ersten Medikamente, die zur Behandlung von Depressionen zu Einsatz kamen, wurden eher zufällig entdeckt. Trizyklische Verbindungen (TCA) zum Beispiel wurden ursprünglich als

antihistaminerge Agenzien eingesetzt. Die ersten Monoaminoxidase Inhibitoren (MAOIs) waren antituberkuläre Medikamente. Durch aufmerksame klinische Beobachtungen wurde jedoch ihre antidepressive Wirkung erkannt. Die Entdeckung der molekularen Ziele der ersten Generation von Antidepressiva (TCAs und MAOIs) führte zur Entwicklung weiterer Generation von Medikamenten, wie der selektiven Serotonin „Reuptake“ Inhibitoren (SSRIs) und der selektiven Norepinephrine „Reuptake“ Inhibitoren (SNRIs). Die zur Behandlung von Depressionen eingesetzten Medikamente lassen sich in die in Tab. 6 zusammengefassten Gruppen einteilen.

**Tab. 6: Antidepressiva und ihre Wirkungsweise.**

<b>Antidepressiva-Gruppe</b>	<b>Wirkstoff</b>	<b>Effekt</b>
Monoaminoxidase-Inhibitoren (MAOIs)	Harmaline, Iproclozide, Iproniazid, Isocarboxazid, Nialamide, Phenelzine, Selegiline, Toloxatone,	Hemmung der Enzymaktivität der Monoaminoxidase und somit des 5-HT-Abbaus
reversible MAOIs (RIMAs)	Brofaromine, Moclobemide	reversible Hemmung der Enzymaktivität der Monoaminoxidase und somit des Serotoninabbaus
Dopamin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (DARIs)	Amineptine, Phenmetrazine, Vanoxerine	Hemmung des Dopamintransporters und somit Erhöhung der extrazellulären Dopaminlevel
Norepinephrin-Dopamin-Wiederaufnahme-Inhibitoren	Bupropion	Hemmung des Norepinephrin- und Dopamintransporters und somit Erhöhung der extrazellulären Norepinephrin- und Dopaminlevel
Norepinephrin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (NRIs oder NARIs)	Atomoxetine, Maprotiline, Reboxetine, Viloxazine	Hemmung des Norepinephrintransporters und somit Erhöhung der extrazellulären Norepinephrinlevel
Serotonin-Norepinephrin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SNRIs)	Duloxetine, Milnacipran, Venlafaxine	Hemmung des 5-HT- und Dopamintransporters und somit Erhöhung der extrazellulären 5-HT- und Dopaminlevel
selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRIs)	Citalopram, Escitalopram, Fluoxetine, Fluvoxamine, Paroxetine, Sertraline,	selektive Hemmung des SERT und somit Erhöhung der extrazellulären 5-HT-Level
selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Verstärker (SSREs)	Tianeptine	selektive Aktivitätserhöhung des SERT und somit Senkung der extrazellulären 5-HT-Level
Tricyclische Antidepressiva (TCAs)	Amitriptyline, Amoxapine, Butriptyline, Clomipramine, Desipramine, Dothiepin, Doxepin, Imipramine,	Hemmung des 5-HT-, Norepinephrin- und Dopamintransporters und somit Erhöhung der extrazellulären 5-HT-, Norepinephrin- und Dopaminlevel
Tetracyclische Antidepressiva	Maprotiline, Mianserin, Nefazodone, Trazodone	Hemmung des 5-HT-, Norepinephrin- und Dopamintransporters und somit Erhöhung der extrazellulären 5-HT-, Norepinephrin- und Dopaminlevel

Trotz der ständigen Weiterentwicklung der zur Behandlung der Depression eingesetzten Medikamente rufen diese allesamt bei einem Großteil der Patienten Nebenwirkungen hervor, die zum Teil sehr unangenehm sind, sich aber nach wenigen Einnahmetagen meist deutlich zurückbilden oder ganz verschwinden. Unglücklicherweise gleichen die Nebenwirkungen oft den Symptomen der Depression, bzw. verstärken die Symptome wenige Tage nach Beginn der Einnahme, bevor sich letztlich die positiven Effekte durchsetzen.

Ein weiterer für den Patienten sehr belastender Aspekt ist die Tatsache, dass die eigentliche, antidepressive Wirkung der Substanzen erst 10 bis 20 Tage oder noch länger nach der ersten Einnahme einsetzt. Die Nebenwirkungen hingegen machen sich meist sofort bemerkbar. Aufgrund der Nebenwirkungen und des verzögerten Einsetzens der Wirkung brechen viele Patienten die Therapie vorzeitig ab oder haben Angst davor, sie überhaupt zu beginnen. Deswegen ist eine einschleichende Dosierung und intensive Betreuung der Erkrankten während der ersten Therapiephase der Depression notwendig. Letzten Endes muss auch erwähnt werden, 25 % - 30% der Patienten nur sehr schwach oder gar nicht auf die medikamentöse Therapie ansprechen (Frazer, 97). Aufgrund der oben beschriebenen Mängel der Antidepressiva wird weiterhin intensiv nach neuen Wirkstoffen und geeigneten Screeningverfahren gesucht.

Neben ihrer Rolle bei der Entstehung von Depressionen scheinen Dysfunktionen des serotonergen Systems auch an der Entwicklung von Zwangserkrankungen (Murphy et al., 89), Angst- und Panikstörungen (Bell und Nutt, 98; Jann und Kurtz, 87) sowie des Borderlinesyndroms (Winchel und Stanley, 91; Higley und Linnoila, 97; Goodman und New, 00) beteiligt zu sein. Anlass zu dieser Vermutung gibt die Tatsache, dass auch diese Erkrankungen erfolgreich mit SSRIs behandelt werden können.

In der Westlichen Welt ist neben den depressiven Erkrankungen die Migräne mit einer Prävalenz von 10 % eine der häufigsten Krankheiten, die mit einer verminderten serotonergen Funktion in Verbindung stehen (Jones und Blackburn, 02; Lipton et al., 02). Bei einem Migräneanfall kommt es zu einem Absinken des 5-HT-Spiegels, das von einer Vasodilatation der arteriellen Hirngefäße begleitet wird. Bei akuten Migräneanfällen werden die Patienten oft mit einer intravenösen 5-HT-Applikation oder mit Triptanen behandelt. Triptane bewirken als 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoragonisten eine Vasokonstriktion im externen Karotiskreislauf und als 5-HT<sub>1D</sub>- und 5-HT<sub>1F</sub>-Rezeptoragonisten eine Inhibition der trigeminovaskulären Entzündung, wodurch der Migräneanfall beendet wird (Villalon et al., 03). Die Migräne wird häufig zu den neuronalen Dysfunktionen gezählt, ist aber eigentlich auf Störungen des peripheren serotonergen Systems zurückzuführen.

Auch Essstörungen wie Adipositas und Bulimie wurden mit einer verminderten serotonergen Transmission in Verbindung gebracht, weil Appetitzügler wie Dexfenfluramine und Sibutramin die synaptische 5-HT-Konzentration erhöhen und die Nahrungsaufnahme durch Beeinflussung des Sättigungsgefühls unterdrücken. In diesem Prozess der Energiehomöostase scheint vor allem der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor eine entscheidende Rolle zu spielen, wie Gewichtszunahme und verstärkte Nahrungsaufnahme von 5-HT<sub>2C</sub>-KO Mäusen andeuten (Leibowitz und Alexander, 98; Nonogaki et al., 98).

Alkoholismus geht ebenfalls mit einem reduzierten 5-HT-Spiegel einher, wie es in Hirnen von Mäusen und Ratten mit erhöhter Alkoholpräferenz und bei genetisch veranlagten Alkoholikern gezeigt werden konnte. In dieses Bild fügen sich Verhaltensmerkmale wie erhöhte Aggressivität, verminderte Impulskontrolle und Depressivität ein (Badawy, 99).

Auch bei Demenzerkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit, bei Chorea Huntington (Yohrling IV et al., 02), Autismus (Chugani, 02) und dem Downsyndrom gibt es Hinweise auf eine verminderte serotonerge Funktion, die aber höchstwahrscheinlich auf Störungen in der pränatalen Entwicklung des serotonergen Systems zurückzuführen sind (Whitaker-Azmitia, 01).

Da die TPH2 nun als das im ZNS aktive Enzym identifiziert werden konnte, rückt sie ins Zentrum der pharmakologischen Forschung. Aufgrund der Tatsache, dass sie am synthesesetchnischen Anfangspunkt des serotonergen Systems steht, stellt die Beeinflussung dieses Enzyms einen wichtigen Angriffspunkt für den Eingriff in das gesamte System dar. Um aber einen solchen Eingriff gezielt durchführen zu können ist eine gründliche biochemische Charakterisierung der TPH und ihrer Regulation nötig. Diese Daten könnten zur Identifizierung von aktivitätsrelevanten Enzymteilen führen und somit als Grundlage für eine pharmakologische Beeinflussung dieser Stellen und somit der TPH-Aktivität dienen.

#### *1.6.2.1 Funktionelle TPH2-SNPs im Menschen*

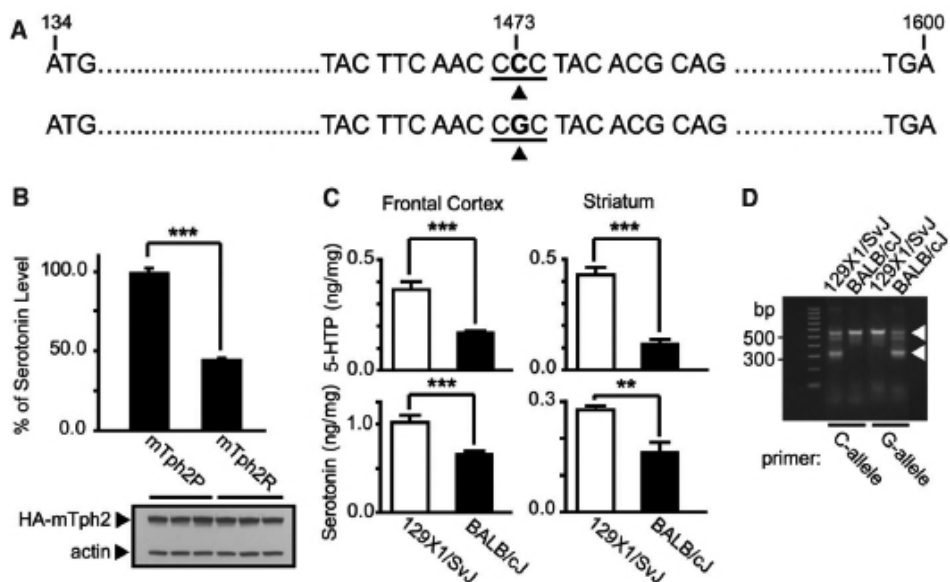
Eine Vielzahl von Studien deutet darauf hin, dass Polymorphismen der TPH2 mit verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen, wie z.B. Depression und Suizidgefährdung (Bach-Mizrachi et al., 06; Van Den et al., 06; Zill et al., 04b; Zill et al., 04a; Ke et al., 06), manisch-depressiver Störung (Harvey et al., 04; Van Den et al., 06) und ADHD (Harvey et al., 04; Sheehan et al., 05)) assoziiert sind. Aber es existieren keine Informationen darüber, wie sich diese Polymorphismen auf die 5-HT-Synthese auswirken.

Kürzlich wurde allerdings der funktionelle SNP<sub>G1463A</sub> in der kodierenden Sequenz der *hTph2* identifiziert, der in einer verringerten 5-HT-Synthese resultiert und in einer Gruppe älterer

Patienten mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung einer Depression und mit einem verminderten Ansprechen auf SSRIs assoziiert ist (Zhang et al., 05). Der G1463A Austausch in der Nucleotidsequenz führt auf Proteinebene zum Austausch des hochkonservierten Arginin 441 mit Histidin. In der Zellkultur zeigten mit dem mutierten hTPH2<sub>441H</sub>-Enzym transfizierte PC12 Zellen eine um 80 % verringerte 5-HT-Synthese. Diese Ergebnisse lassen eine direkte Verbindung zwischen einer genetisch bedingten Störung der 5-HT-Synthese, Depressionen und dem Ansprechen auf medikamentöse Therapie erkennen. Leider konnte der besagte Polymorphismus nicht in anderen Gruppen psychiatrische Patienten und Kontrollpersonen gefunden werden (Blakely, 05; Zhou et al., 05; Glatt et al., 05; Van Den et al., 05; Bicalho et al., 06; Delorme et al., 06; Garriock et al., 05).

#### 1.6.2.2 Funktionelle TPH2-SNPs in der Maus

Auch in der Maus wurde ein funktioneller SNP (C1472G) in der codierenden Sequenz der *mTph2* identifiziert (Abb. 12), der sich in der gleichen Region wie der im vorhergehenden Abschnitt beschriebene, die Hypofunktion der hTPH2 auslösende SNP befindet (Zhang et al., 04). Der Maus-SNP resultiert in einem Austausch der hochkonservierten Aminosäure Prolin 447 mit Arginin. Dies reduziert die Fähigkeit der das 1473G Allel tragenden Mäuse zur 5-HT-Synthese im Hirn (Cervo et al., 05; Zhang et al., 04). Das mutierte mTPH2<sub>447R</sub>-Enzym zeigt *in vitro* einen im Vergleich zum Wildtyp Allel um 50 % reduzierten  $V_{\max}$ -Wert (Sakowski et al., 06a).



**Abb. 12: SNP<sub>C1473G</sub> in Mäusen nach (Zhang et al., 04).** (A) SNP<sub>C1473G</sub> im *mTph2*-Gen. (B) In HA-mTPH2<sub>447R</sub>-exprimierenden Zellen waren die 5-HT-Level bei gleicher Proteinmenge niedriger als in HA-mTPH2<sub>447P</sub>-exprimierenden Zellen (n = 6). (C) BALB/cJ hatten im Vergleich zu 129X1/SvJ Mäusen niedrigere 5-HT-Syntheseraten und Gewebelevel im Frontalen Cortex und im Striatum (n = 7). Genotypisierung von BALB/cJ und 129X1/SvJ Mäusen mit C- und G-Allel spezifischen Primern und TPH2-Kontrollprimern.

Durch die Genotypisierung von Inzuchtmausstämmen konnten Stämme, die homozygot für das 1473C oder 1473G Allel sind, identifiziert werden (Tab. 7). 129/Sv und BALB/cJ Mäuse, die homozygot für das 1473C bzw. 1473G Allel sind, zeigten in einer früheren Studien signifikante Verhaltensunterschiede (Lucki et al., 01) im Forced Swimming Test, der zur Bestimmung depressionsähnlichen Verhaltens genutzt wird. Zhang *et al.* (Zhang et al., 04) sehen darin im Zusammenhang mit ihren eigenen Daten eine Hinweis darauf, dass die TPH2 nicht nur die 5-HT-Synthese und damit die 5-HT-Level im Gehirn kontrolliert, sondern auch direkt an der Kontrolle des Verhaltens beteiligt ist.

**Tab. 7: Verteilung der 1473C und 1473G Allele auf verschiedene Inzuchtstämme (Zhang et al., 04; Cervo et al., 05; Isles et al., 05; Zhang et al., 04; Kulikov et al., 05b; Kulikov et al., 05a).**

<b>mTPH21473C/C</b>	<b>mTPH21473G/G</b>
C57BL/6J	DBA/2
C57BL/6N	BALB/c
129/Sv	A/J
AKR/J	CBA/Ca
YT/Y	
DD/He	
PT/Y	
CBA/Lac	

Eine Einschränkung von Zhangs Versuchen und Schlussfolgerungen ist die Tatsache, dass auch genetische Unterschiede, die nichts mit dem untersuchten *Tph2*-Gen in Verbindung stehen, zum beobachteten Verhaltensphänotyp beitragen bzw. diesen komplett erzeugen könnten. Alternative Strategien wie die Generierung von TPH2-knock-out Mäusen, knock-in Mäusen mit funktionellen Mutationen der TPH2 oder die Erzeugung congener Mäuse durch eine Rückkreuzung, die entweder das 1473C oder 1473G Allel tragen, könnten dieses Problem umgehen.

#### *1.6.2.3 Mausmodelle zur Untersuchung von Depression und anderen psychiatrischen Erkrankungen*

Mausmodelle werden in der Depressionsforschung hauptsächlich für zwei Fragestellungen genutzt: Für die Detektion der klinischen Wirksamkeit von Antidepressiva und um depressions- bzw. antidepressionsverwandte Phänotypen in genetisch veränderten Mäusen festzustellen.

Aufgrund des heterogenen und facettenreichen Charakters der Krankheitsbildes Depression auf psychologischem und physiologischem Niveau ist es aber schwierig diese Krankheit in einem Labor „nachzuahmen“. Viele der Symptome, wie z.B. immer wiederkehrende Gedanken an Tod und Selbstmord oder Schuldgefühle, lassen sich unmöglich im Mausmodell nachstellen. Daher stellt sich die Frage, ob man jemals wirklich schlussfolgern kann, ob eine Maus depressiv ist (Cryan et al., 05).

Dennoch gibt es eine Vielzahl von Verhaltenstests, mit deren Hilfe man standardmäßig das Angst- und depressionsähnliche Verhalten von Mäusen untersucht. Die am häufigsten verwendeten Tests sind in Tab. 8 aufgeführt.

**Tab. 8: Beispiele für in der Depressionsforschung genutzte Tiermodelle nach (Nestler et al., 02).**

<b>Model</b>	<b>Test auf ...</b>	<b>Durchführung</b>
Forced Swimming Test (FST)	depressionsähnliches Verhalten / Wirksamkeit von ADs	Wenn Mäuse dazu gezwungen werden, in einem mit lauwarmen Wasser gefüllten Zylinder zu schwimmen, dann versuchen sie zuerst zu entkommen, stellen aber irgendwann ihre Bewegungen nahezu gänzlich ein und treiben nur noch im Wasser. Man vermutet, dass diese charakteristische bewegungslose Haltung einen depressionsähnlichen Zustand darstellt, der nachweislich leicht durch eine Vielzahl von Antidepressiva beeinflusst werden kann.
Elevated Plus Maze Test (PM)	Angstverhalten	Der Grad, zu dem Tiere eine bestimmte Umgebung (offene Flächen, hell erleuchtetes Gebiet, erhöhtes Terrain) erkunden, ist ein Maß für den Grad ihrer Ängstlichkeit. Dieses Erkundungsverhalten ist durch anxiolytische (angstlösende) Medikamente beeinflussbar.
Open Field Test		
Dark-Light Choice Test		
Tail Suspension Test (TST)	depressionsähnliches Verhalten / Wirksamkeit von ADs	Wenn Mäuse in einer kopfüberhängenden Position am Schwanz fixiert werden, dann versuchen sie zuerst durch heftige Bewegungen zu entkommen, stellen aber irgendwann ihre Bewegungen nahezu gänzlich ein. Man vermutet, dass diese bewegungslose Haltung einen depressionsähnlichen Zustand darstellt, der nachweislich leicht durch eine Vielzahl von Antidepressiva beeinflusst werden kann.



## 1.7 Zielsetzung

Ausgangspunkt der Arbeit war das bislang unbekannte TPH-Isozym TPH2. Bis zur Entdeckung der TPH2 im Jahre 2003 galt die TPH1 als einzige 5-HT-Quelle des Körpers. Nun zeigte sich, dass die TPH1 lediglich der Ausgangspunkt des serotonergen Systems der peripheren Organe ist, wohingegen die TPH2 die 5-HT-Synthese im ZNS initialisiert.

Es sollte nun zunächst eine grundlegende Charakterisierung der TPH2 und eine Abgrenzung gegenüber der bereits bekannten TPH1 erfolgen. Dabei sollten grundlegende Aspekte wie die Expression und die biochemischen Eigenschaften untersucht werden. Die möglicherweise durch diese Charakterisierung identifizierten Unterschiede könnten nämlich einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung selektiv wirkender, die TPH-Aktivität modulierender Substanzen liefern, die eine Beeinflussung des serotonergen Systems des ZNS ohne Einflussnahme auf die Peripherie oder umgekehrt ermöglichen würden. Bei diesen Untersuchungen sollten die sich von der TPH1 stark unterscheidenden N- und C-Termini der TPH2 besondere Beachtung finden. Auch die Phosphorylierung der TPH2 sollte als möglicherweise auf die Enzymaktivität regulatorisch wirkende Modifikation Gegenstand der Untersuchungen sein. Als zwei weitere Aspekte der Arbeit waren die Entwicklung eines High-Throughput-Assays zur Identifizierung TPH-aktivitätsbeeinflussender Substanzen und die Identifizierung von TPH2-Interaktionspartnern durch ein Yeast-Two-Hybrid Screening geplant. Neben diesen *in vitro* Studien sollte in zwei weiteren *in vivo* Projekten die mögliche TPH-Expression in endometrialen Karzinomen untersucht und die Relevanz eines funktionellen SNPs in der kodierenden Sequenz der mTPH2 für das Verhalten der betroffenen Mäuse geklärt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tab. 9: Chemikalien.**

Chemikalie	Hersteller, Standort
10 x Zelllysispuffer	CellSignaling, Danvers, MA, USA
5-HT	Sigma, Steinheim
5-HTP	Sigma, Steinheim
6MPH4	Sigma, Steinheim
Acrylamid-/Bisacrylamid 19:1	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-/Bisacrylamid 37,5:1	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Sigma, Steinheim
Bactoagar	Difco Microbiology
Bactotrypton	Difco Microbiology
BH4	Sigma, Steinheim
Borsäure	Sigma, Steinheim
Bradford Reagenz	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
BSA	Sigma, Steinheim
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma, Steinheim
DAPI	Sigma, Steinheim
DEPC	Serva, Heidelberg
DMEM	Gibco, Paisley, Scotland, UK
DNaseI	Boehringer Mannheim, Mannheim
dNTPs	Amersham Bioscience, NJ, USA
DTT	Sigma, Steinheim
EDTA	Sigma, Steinheim
EGTA	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	Sigma, Steinheim
FKS	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Fluoreszenzeinbettungsmedium	Dako, Glostrup, DK
G-418	Sigma, Steinheim
Glucose	Sigma, Steinheim
Glycerol	Roth, Karlsruhe
$\text{H}_2\text{O}_2$	Sigma, Steinheim
Ham's F12K	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Harnstoff	Sigma, Steinheim
HCl	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
IPTG	Fermentas, Burlington, CDN
Kaliumacetat	Sigma, Steinheim

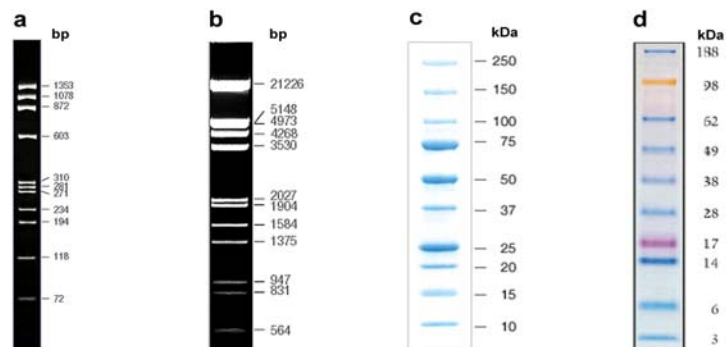
Kanamycin	Sigma, Steinheim
KCl	Sigma, Steinheim
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Lipofectamine™2000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
L-Trp	Roth, Karlsruhe
MEM	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Sigma, Steinheim
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma, Steinheim
NP-40	Sigma, Steinheim
NSD1015	Sigma, Steinheim
NTPs	Promega, Madison, WI, USA
Paraffin	Roth, Karlsruhe
PCPA	Sigma, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Perchlorsäure 70 %	Sigma, Steinheim
PFA	Roth, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Cocktail I + II	Roche, Mannheim
PMSF	Sigma, Steinheim
Random Hexamer Primer	Boehringer Mannheim, Mannheim
RNasin	Promega, Madison, WI, USA
Roti®-Block	Roth, Karlsruhe
Roti®-Load	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Sigma, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
TRIZOL	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trp	Sigma, Steinheim
Trypsin/EDTA	Gibco, Paisley, Scotland, UK
Tween-20	Sigma, Steinheim
[α- <sup>32</sup> P] UTP	PerkinElmer, Meriden, CT, USA
X-Gal	Fermentas, Burlington, CDN
Xylol	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
[γ- <sup>32</sup> P] ATP	PerkinElmer, Meriden, CT, USA

---

## 2.1.2 Kits, Enzyme und Marker

**Tab. 10: Kits, Enzyme und Marker.**

Komponente	Hersteller, Standort
6-Sulfatoxymelatonin ELISA	Bühlmann Laboratories, Salzburg, AT
Expand™ Long Template PCR System	Boehringer Mannheim, Mannheim
FirstChoice™ RML-RACE Kit	Ambion, Austin, TX, USA
Invisorb Spin Blood Midi Kit	Invitex, Berlin-Buch
JetStar Plasmid Purification MAXI Kit 2.0	Genomed GmbH, Löhne
ProFound™ Mammalian c-Myc Tag IP/Co-IP Application Set	Pierce, Rockford, IL, USA
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange® II Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Cedar Creek, TX, USA
QuickSpin Columns for radiolabeled DNA purification	Roche, Mannheim
R.T.U. VECTASTAIN® Universal <sub>Elite</sub> ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
RPA II Kit	Ambion, Austin, TX, USA
SuperSignaling® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
VECTASTAIN® ABC-AP Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System	Promega, Madison, WI, USA
DNaseI	Roche, Mannheim
Katalase	Sigma, Steinheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, WI, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RNaseA	Boehringer Mannheim, Mannheim
SP6-RNA-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, WI, USA
T7-RNA-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
TaqDNA Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PKA	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Precision Blue Protein™ Standard All Blue	BioRad Laboratories Richmond, USA
SeeBlue®Plus2 Pre-stained Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
λ DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker, 3	Fermentas, Burlington, CDN
Φ174 DNA/ <i>BsuRI</i> ( <i>HaeIII</i> ) Marker, 9	Fermentas, Burlington, CDN



**Abb. 13: Marker.** a: λ DNA/*EcoRI* + *HindIII* Marker, 3; b: Φ174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) Marker, 9; c: Precision Blue Protein™ Standard; d: All Blue SeeBlue®Plus2 Pre-stained Protein Standard

### 2.1.3 Antikörper

**Tab. 11: Antikörper.**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Block/Verdünnung in</b>	<b>Hersteller, Standort</b>
<b>primär:</b>			
sheep anti-TPH1/2	1:1000	Roti <sup>®</sup> -Block	Abcam, Cambridge, UK
rabbit anti-TPH2	1:1000	Roti <sup>®</sup> -Block	Abcam, Cambridge, UK
sheep anti TPH1/2	1:1000	Roti <sup>®</sup> -Block	Biotrend, Köln
	1:500	10 % Serum* in TBS für IHC	
mouse anti-TPH	1:1000	5% Milchpulver in PBST	Sigma, Steinheim
mouse anti-FLAG M2	1:2000	3% Milchpulver in TBS	Sigma, Steinheim
	1:500	10% Serum* in PBS für ICC	
mouse anti-myc	1:5000	5% Milchpulver in PBST	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
rabbit anti-myc	1:200	10% Serum* in PBS für ICC	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
rabbit anti-5-HT	1:500	10 % Serum* in TBS für IHC	Sigma, Steinheim
rabbit anti-5-HTP	1:500	10 % Serum* in TBS für IHC	Abcam, Cambridge, UK
rabbit anti-Östrogenrezeptor	1:500	10 % Serum* in TBS für IHC	Abcam, Cambridge, UK
<b><math>\alpha/\beta</math></b>			
<b>sekundär:</b>			
goat anti-mouse HRP	1:2000	wie primärer Antikörper	Pierce, Rockford, IL, USA
goat anti-rabbit HRP	1:2000	wie primärer Antikörper	Pierce, Rockford, IL, USA
rabbit anti-sheep HRP	1 :10.000	wie primärer Antikörper	Sigma, Steinheim
donkey anti-rabbit Cy3	1:100	wie primärer Antikörper	Jackson Immuno Research, Suffolk UK
donkey anti-mouse FITC	1:100	wie primärer Antikörper	Jackson Immuno Research, Suffolk UK
diverse HRP und AP	1:500	wie primärer Antikörper	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
gekoppelte Antikörper aus den VECTASTAIN <sup>®</sup> Kits			

\* Es wurde immer das Serum derjenigen Spezies verwendet, in welcher der sekundäre Antikörper produziert worden war.

### 2.1.4 Vektoren

- pcDNA3.1+/- (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- pcDNA3.1 myc-HIS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- pGEM<sup>®</sup>-T (Promega, Madison, WI, USA)
- pGEM<sup>®</sup>-T<sub>easy</sub> (Promega, Madison, WI, USA)
- pMAL – c2X (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- pGAD427 und pBTM117c (AG Wanker, MDC, Berlin-Buch)

### 2.1.5 Primer

Alle verwendeten Primer wurden bei den Firmen BioTez GmbH (Berlin-Buch) oder TIB MolBiol (Berlin) bestellt und sind im Kapitel PCR aufgeführt. Die Mutageneseprimer wurden FPLC-aufgereinigt bestellt.

### 2.1.6 Peptide

Alle verwendeten Peptide wurden von der Firma Biosynthan GmbH (Berlin-Buch) synthetisiert.

N-terminales Peptid:

MQPAMMMFSSKYWARRGFSLDSAVPEEHQLLGSSTLNKPNSGKN-OH x TFA  
(4931 g/mol)

C-terminales Peptid:

SIENVVQDLRSDLNTVCDALN-OH x TFA (2319 g/mol)

### 2.1.7 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammten aus den Beständen der Zellbank ATCC (Rockville, MD, USA).

Tab. 12: Zelllinien.

Zelllinie	Organismus	Organ
COS7	<i>Cercopithecus aethiops</i> , Meerkatze	Grüne Niere
HEK293	<i>Homo sapiens</i>	Niere
P815	<i>Mus musculus</i>	Mastzellen (Mastocytoma)
TT	<i>Homo sapiens</i>	Schilddrüse – Medulla (Carcinom)

## 2.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterial

**Tab. 13: Geräte und Verbrauchsmaterialien.**

Gerät und Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Standort
8-Kanal-Pipette M300	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
96-Well-Fluoreszenzleser Fluoroscant Ascent FL	Labsystems, Ramsey, MS, USA
96-Well-Photometer anthos htII	Anthos Labtech Instruments, Salzburg, AT
Aldo-Xer-Geltrockner	Schütt-Labortechnik, Göttingen
Automatische Pipette Witepod XP	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim
Bakterienschüttler Certomat®H	B.Braun, Melsungen
Binokular MZFLIII	Leica, Wetzlar
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
C18 Protein und Peptid HPLC Säule	Vydac™, Hesperia, CA, USA
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene®Nunc, Rochester, NY, USA
Dialyseplättchen	Millipore, Billerica, MA, USA
Einwegpipetten Cellstar® 1, 2, 5, 10, 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Elektroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Tubes	TPP®, Trasadingen, Schweiz
Feinwaage	Sartorius Research, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
GenePulse® Küvetten	BioRad Laboratories Richmond, USA
Horizontale Agarosegelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
HPLC-Anlage	Shimadzu, Duisburg
Hybridisierungsofen 3032	GFL, Hannover
Inkubator Zellkultur Heracell	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Kryoröhrchen Cryo.S	Greiner bio-one, Frickenhausen
Kühlzentrifuge Sigma 3K12	Sigma, Osterode am Harz
Kühlzentrifuge Sorvall®PC5C Plus	Kendro, Hanau
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
LabTec Chamber Slides	Nunc, NY, USA
Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 1900 TR	PerkinElmer, Meriden, CT, USA
Magnetrührer MR3001	Heidolph, Schwabach
Mikrotom SM2500	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrowelle 8020	Privileg, Fürth
Mikroskop CKX31	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Nitrocellulosemembranen	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
Nylonmembranen	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Tubes	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
pH-Meter pH Level 1	WTW, Weilheim
Phosphoimager Fujix BAS2000	Fuji, Tokyo, J
Phosphoimagerplatte BAS-III	Fuji, Tokyo, J
Photometer GeneQuant pro	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
Pipetten	Gilson, Langenfeld
Pipettierroboter Biomek®FX	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Potter-Homogenisator	Roth, Karlsruhe
Präzisions-Quarzglasküvetten Suprasil®	Hellma, Müllheim
PVDF-Membranen	Amersham Bioscience, Little Chalfon, UK
Refrigerated Condensation Trap RT100	Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA
Roller Mixer SRT1	Snijders, Tilburg, NL

Röntgenfilme X-ray Retina	Fotochemische Werke GmbH, Berlin
Save-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
Schwenkplattform Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
SDS-PAGE-Gelelektrophoresekammer	BioRad Laboratories Richmond, USA
Spannungsquellen PowerPac™HC	BioRad Laboratories Richmond, USA
SpeedVac SVC100	Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA
Spottingroboter K2 für High throughput applications	KBiosystems, Essex, UK
Sterilbank Laminair® HB2448	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Tankblotter	BioRad Laboratories Richmond, USA
Test-Tube Rotator	Snijders, Tilburg, NL
Thermocycler PTC-200	BioRad Laboratories Richmond, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tierfutter	Ssniff, Soest
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Labofuge 400e	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Transilluminator MultiImage™Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation, CA, USA
Ultraschallgerät Sonoplus	Bandelin electronic, Berlin
Ultra-Turrax T25 basic	IKA® Labortechnik, Staufen
Vakuumpumpe Vacuase comfort	IBS Integra Bioscience, Chur, SUI
Vertikale Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Vortexer Genic 2	Bender & Hobein AG, Zürich, SUI
Waage 440-43N	Kern & Sohn GmbH, Baldingen-Frommern
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Whatmanpapier	Whatman® International, Maidstone, UK
Zellkulturschalen und -flaschen	TPP®, Trasadingen, SUI

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren

##### 2.2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA der Bakterien wurde mittels alkalischer Lyse nach Birnboim & Doly (Birnboim und Doly, 79) isoliert. Die Bakterien kleiner Ansätze (ca. 2 ml LB-Medium) wurden pelletiert, in GTE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe des gleichen Volumens Lysispuffer aufgelöst. Durch Zugabe von 1.7 M Kaliumacetat (Endkonzentration) wurden die genomische DNA und Zelltrümmer ausgefällt und durch eine Zentrifugation pelletiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol ausgefällt, mit 75 %igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer bzw. ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Bei größeren Ansätzen (ca. 250 ml Kulturmedium) wurde zur Plasmidisolierung der JetStar Plasmid Purification MAXI Kit 2.0 nach den Angaben des Herstellers genutzt.



<b>GTE-Puffer</b>	Glucose	50 mM
	EDTA pH 8.0	10 mM
	Tris-HCl pH 8.0	25 mM
	RNaseA	0.4 mg/ml
<b>Lysispuffer</b>	NaOH	100 mM
	SDS	0.5 %
<b>TE-Puffer</b>	Tris-HCl pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

#### 2.2.1.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus Geweben, Zellen und Blutproben

Für die Genotypisierung der Versuchstiere wurde ihre genomische DNA benötigt. Hierzu wurden Schwanzbiopsien über Nacht in je 100 µl Ohrenpuffer bei 55°C verdaut. Anschließend wurde die im Puffer enthaltene Proteinase K durch Erhitzen der Proben für 10 min auf 95°C denaturiert. Zu den Proben wurden dann je 750 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNaseA gegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Lösungen für die PCR verwendet werden.

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Zellen wurden diese durch Zentrifugation pelletiert (5000 g, 5 min, RMT) und anschließend wie die Schwanzbiopsien weiterbehandelt. Bei Zellen reichte allerdings ein Verdau von 4 h bei 55°C aus.

<b>Ohrenpuffer</b>	Tris-HCl pH 8.0	100 mM
	Proteinase K	1 mg/ml
	EDTA	5 mM
	NaCl	200 mM
	SDS	0.2 %
<b>TE-Puffer</b>	Tris-HCl pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

Die genomische DNA aus Patientenblut wurde mit Hilfe des Invisorb Spin Blood Midi Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert.

### 2.2.1.1.3 Isolierung von RNA aus Geweben und Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben wurde die TRIZOL-Reagenz genutzt. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet. 100 mg Gewebe wurden in 1 ml TRIZOL aufgenommen und so lange mit dem Ultra-Turrax homogenisiert, bis das Gewebe vollständig zerstört war. Die Zellen einer 10 cm Zellkulturschale wurden ebenfalls in 1 ml TRIZOL lysiert. Die durch Isopropanolfällung gereinigte RNA wurde anschließend in DEPC-Wasser aufgenommen.

Die RNA-Isolierung mit TRIZOL hat den Vorteil der geringen DNA-Kontamination. Trotzdem wurden die RNA-Präparationen vor ihrer Verwendung bei der cDNA-Herstellung für 30 min mit 0,1 u/μL DNase I inkubiert. Anschließend wurde die DNase hitzeinaktiviert.

<b>DEPC-Wasser</b>	DEPC	0.1 %
	über Nacht bei 37°C gerührt, dann autoklaviert	

### 2.2.1.2 *Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren*

Die OD<sub>260</sub>- und OD<sub>280</sub>-Werte der Nukleinsäurelösungen wurden in Präzisions-Quarzglasküvetten am Photometer bestimmt. Bei Verhältnissen von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> > 1.7 wurden die Proteinkonzentrationen vernachlässigt und die Nukleinsäurekonzentrationen folgendermaßen bestimmt:

**DNA**                      OD<sub>260</sub> = 1 = 50 μg/ml doppelsträngige DNA

**RNA**                      OD<sub>260</sub> = 1 = 40 μg/ml RNA

Verhältnisse von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> < 1.7 wiesen auf einen hohen Proteingehalt der Lösungen hin. Die Nukleinsäuren wurden in solchen Fällen durch eine Phenolextraktion gereinigt und erneut vermessen.

### 2.2.1.3 *Lagerung von Nukleinsäuren*

DNA wurde in TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O gelöst bei –20°C aufbewahrt, RNA und cDNA dagegen in DEPC-Wasser bei –80°C. Primerstocks wurden in TE-Puffer, die niedriger konzentrierten Arbeitslösungen dagegen in reinem ddH<sub>2</sub>O bei –20°C gelagert.

#### 2.2.1.4 Auftrennung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Gelen

##### 2.2.1.4.1 Auftrennung von DNA mit Hilfe von Agarosegelen

DNA-Moleküle wurden je nach erwarteter Länge in 1 bis 2 %igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurden die DNA-Gemische mit circa 0.1 Volumen 10 x DNA-Probenpuffer versetzt, auf die Agarosegele aufgetragen und in TAE-Puffer bei 1-8 V/cm gelelektrophoretisch behandelt. Zur Visualisierung der DNA wurden die Gele mit ca. 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und im Transilluminator mit UV-Licht (300 nm) bestrahlt. Die Größen und Konzentrationen der einzelnen aufgetrennten DNA-Banden konnten durch Vergleich mit den  $\lambda$  DNA/*EcoRI* + *HindIII* und  $\Phi$ 174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) Molekulargewichtsmarkern abgeschätzt werden.

<b>TAE-Puffer</b>	Tris-Acetat pH 7.8	40 mM
	EDTA	1 mM
<b>10 x DNA-Proben-Puffer</b>	Saccharose	40 %
	Bromphenolblau	0.02 %
	in TE-Puffer	

##### 2.2.1.4.2 Auftrennung von DNA mit Hilfe von Polyacrylamidgelen

Für die Auftrennung sehr kleiner DNA-Fragmente mit geringem Größenunterschied wurden 10 %ige Polyacrylamidgele und TBE als Laufpuffer verwendet. Die Gele enthielten 10 % Acrylamid-/Bisacrylamid 19:1, 25 % Glycerol, 10 % 10 x TBE, TEMED und APS. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt.

<b>TBE-Puffer</b>	Tris	130 mM
	Borsäure	45 mM
	EDTA	2.5 mM

##### 2.2.1.4.3 Auftrennung von RNA

##### 2.2.1.5 *Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen*

Die durch Agarosegelelektrophorese nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht (300 nm) visualisiert, die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel isoliert. Ein Aliquot der isolierten DNA wurde erneut

einer Agarosegelelektrophorese unterzogen und Ausbeute und Fragmentgröße durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker abgeschätzt.

#### 2.2.1.6 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Restriktionsenzyme wurden mit den vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Reaktionspuffern verwendet. Ein analytischer Restriktionsansatz enthielt ca. 0.2-1 µg DNA, 1 µl des entsprechenden 10-fach-Puffers, 1 µl (circa 10 u) des Restriktionsenzym und ddH<sub>2</sub>O ad. 10 µl. Die Ansätze wurden 1-2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Sollte DNA im präparativen Maßstab geschnitten werden, wurden bis zu 50 µg DNA in einem entsprechend größerem Volumen mit ca. 50 u Restriktionsenzym über Nacht angesetzt. Bei Doppelrestriktionen wurde ein Puffer gewählt, in dem beide Restriktionsenzyme über eine Aktivität von 75-100 % verfügten.

#### 2.2.1.7 Ligation von Nukleinsäuren

Für die Ligation doppelsträngiger DNA in Plasmid-DNA wurden folgende Ansätze genutzt: ca. 25 ng Vektor-DNA, zu klonierendes Fragment im 2-5-fachen molaren Überschuß, 1 µl des 10-fach Ligasepuffers, 1 µl T4-DNA-Ligase (1 u/µl) und H<sub>2</sub>O ad. 10 µl. Die Ansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert und dann für die Transformation in Bakterien verwendet.

#### 2.2.1.8 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen von Plasmiden und PCR-Produkten wurden von der Firma Invitex (Berlin-Buch) durchgeführt. Ein Großteil der benötigten Primer wurde von der Firma bereitgestellt, alle weiteren Primer sind in Tab. 14 aufgelistet.

**Tab. 14: Sequenzierprimer**

Konstrukt	Primerbezeichnung	Sequenz 5'→3'
pBTM Vektor	BTM-5plus	tcg tag atc ttc gtc agc ag
	BTM-3min	agc aac ctg acc tac agg
pGAD Vektor	GAD-5plus	tac cac tac aat gga tga tgt
	GAD-3min	gca cag ttg aag tga act tgc
pcDNA3.1 Vektor	pcDNA3.1 for	gag gtc tat ata agc aga gc
	pcDNA3.1 rev	cct tcc agg gtc aag gaa g
hTPH1 Exon 1	hTPH1 Exon1for	gtt atc aaa tat tgt ctg cat tg
	hTPH1 Exon1rev	cat ttc tag aag aat tct gtg c
hTPH1 Exon 2	hTPH1 Exon2for	ctg ttc tga gaa gtg tga atc
	hTPH1 Exon2rev	agg tgt ttc atc ttc taa gta g
hTPH1 Exon 3	hTPH1 Exon3for	aat taa aac tct cat cca act g
	hTPH1 Exon3rev	aga agc aga ggt tgc agt aag

hTPH1 Exon 4 und 5	hTPH1 Exon4/5for	ccc tt t aat ata ata gct cta g
	hTPH1 Exon4/5rev	gat caa aac aga gtt cag caa c
hTPH1 Exon6	hTPH1 Exon6for	ata gtt tcc atg cct tcc atc
	hTPH1 Exon6rev	aac cat ttg atg aat tcc tgg c
hTPH1 Exon7	hTPH1 Exon7for	agt att atc acc cga tca tta g
	hTPH1 Exon7rev	aac tac aca gat act cat aca c
hTPH1 Exon8	hTPH1 Exon8for	gaa aga ctt gtg aac tag act g
	hTPH1 Exon8rev	tag taa gct ctt gtt caa aag c
hTPH1 Exon9	hTPH1 Exon9for	agt aat atg ttt aga ggt gag c
	hTPH1 Exon9rev	gct tac ttc tgt gac ttg tta c
hTPH1 Exon10	hTPH1 Exon10for	ggt tgt aca cat atc taa caa g
	hTPH1 Exon10rev	ccg aat tga tgc tca aat gtt c
hSERT Exon 1	hSERT Exon1for	gca ttt gta atc ccg tta act aat g
	hSERT Exon1rev	cct ggg tca cag cct cta c
hSERT Exon 2	hSERT Exon2for	ctg aca ctc aca tca tcc gg
	hSERT Exon2rev	ttc ctg aga ggc tcc act tac
hSERT Exon 3	hSERT Exon3for	ctc cag tgc ccc gtt tca g
	hSERT Exon3rev	ctg ccc cta aca ggc caa c
hSERT Exon 4	hSERT Exon4for	tcc cgg gca ccc tca aag
	hSERT Exon4rev	tgg gca ggc ctg ggt cag
hSERT Exon 5	hSERT Exon5for	tga cat cca ttc acc cac ctc
	hSERT Exon5rev	tag taa aat gac aga cag gta cac
hSERT Exon6	hSERT Exon6for	act tag cca cat gga ggc ag
	hSERT Exon6rev	ctc acg cca ctt tca agc ttt g
hSERT Exon7	hSERT Exon7for	agg cag ggc agg cac acg
	hSERT Exon7rev	aaa gca act cag tag gag caa g
hSERT Exon8	hSERT Exon8for	ctt gtg atg aga att gta act gtt g
	hSERT Exon8rev	cct ctt cat cct ccc aca gc
hSERT Exon9	hSERT Exon9for	acc agt cac tta gca acc tta c
	hSERT Exon9rev	gcc cta ggg gag gcc aac
hSERT Exon10	hSERT Exon10for	att ttt cca gaa tga ttc taa gtg ag
	hSERT Exon10rev	gat ggt gta gaa ggg acc cag
hSERT Exon11	hSERT Exon10for	gtg ctg atc ctg tga ctc tg
	hSERT Exon10rev	tct ttc gcc agg gca agg ag
hSERT Exon12	hSERT Exon10for	gta tct tag ctt tag catt tgg tg
	hSERT Exon10rev	ccc aaa aca att agt agt ctg aac
hSERT Exon13	hSERT Exon10for	cta ttc caa ctc gct ctt aga tg
	hSERT Exon10rev	tag ctg gaa act cat tca ctt gg

---

### 2.2.1.9 Reverse Transkription

Die Erstellung von cDNA aus mit DNaseI vorbehandelter Gesamt-RNA wurde folgendermaßen durchgeführt: Die RNA wurde mit 6.5 µM Random Hexamer Primern in DEPC (Endvolumen 15.25 µl) für 3 min bei 80°C denaturiert und sofort auf 0°C abgekühlt. Danach wurde pro Ansatz der in Tab. 15 angegebene Mastermix hinzu pipettiert.

**Tab. 15: Reaktionsansatz für Reverse Transkription.**

Komponente	Volumen
1st strand buffer (5 x)	6 µl
dNTPs (5 mM)	3 µl
RNasin (40 u/µl)	0.75 µl
DTT (100 mM)	3 µl
M-MLV (200 u/µl)	2 µl

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte wiederum für 10 min eine Denaturierung bei 80°C, die mit einer schnellen Abkühlung auf Eis endete. Die erhaltene cDNA-Lösung konnte nun als Template für eine PCR eingesetzt werden.

### 2.2.1.10 Polymerasekettenreaktion

#### 2.2.1.10.1 PCR zur Genotypbestimmung

Die PCR zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse der BL6 x DBA Rückkreuzung wurde unter Verwendung der *Taq* DNA Polymerase mit dem in Tab. 16 abgebildeten Reaktionsansatz durchgeführt.

**Tab. 16: Reaktionsansatz für Genotypisierung.**

Komponente	Volumen
genomische DNA	5 µl
PCR-Puffer (10 x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2.5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer control for (10 µM)	1 µl
Primer control rev (10 µM)	1 µl
Primer C-/G-Allel (10 µM)	1 µl
TaqPolymerase (5 u/µl)	0.5 µl
ddH <sub>2</sub> O	33 µl

Die Ansätze wurden auf Eis in dünnwandigen PCR-Gefäßen zusammengestellt und in eine auf 95°C vorgeheizte PCR-Maschine überführt.

**Tab. 17: PCR-Programm Genotypisierung.**

Schritt	Bezeichnung	Zeit	Temperatur
1	Denaturierung	5 min	95°C
2 x 34	Denaturierung	45 sec	94°C
	Annealing	30 sec	66°C
	Elongation	30 sec	72°C
3		10 min	72°C
4		forever	4°C

Anschließend erfolgte die Untersuchung der PCR-Produkte durch elektrophoretische Auftrennung auf einem 2 %igen Agarosegel. Dabei ergaben sich die in Tab. 18 aufgeführten Fragmente.

**Tab. 18: Genotypisierungsprimer.**

Produkt	Primerbezeichnung	Sequenz 5'→3'	Bandengröße
mTPH2 Kontrollbande	TPH2 con for	ttt gac cca aag acg acc tgc ttg ca	523 bp
	TPH2 con rev	tgc atg ctt act agc caa cca tga cac a	
mTPH2 C Allel	TPH2 con for	ttt gac cca aag acg acc tgc ttg ca	307 bp
	TPH2 C allel	cag aat ttc aat gct ctg cgt gtg gg	
mTPH2 G Allel	TPH2 con for	ttt gac cca aag acg acc tgc ttg ca	307 bp
	TPH2 G allel	cag aat ttc aat gct ctg cgt gtg gc	

#### 2.2.1.10.2 PCR kleiner Fragmente

Kurze DNA-Stücke für die Klonierung der RPA-Sonden oder zum Nachweis der TPH-Expression in unterschiedlichen Geweben wurden ebenfalls mit Hilfe der *Taq*DNA Polymerase amplifiziert. Bei der verwendeten Template-DNA handelte es sich um cDNA.

**Tab. 19: Reaktionsansatz zur Amplifikation kleiner Fragmente.**

Komponente	Volumen
DNA	5 µl
PCR-Puffer (10 x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2.5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer for (10 µM)	1 µl
Primer rev (10 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 u/µl)	0.5 µl
ddH <sub>2</sub> O	34 µl

**Tab. 20: PCR-Programm zur Amplifikation kleiner Fragmente.**

Schritt	Bezeichnung	Zeit	Temperatur
1	Denaturierung	5 min	94°C
2 x 34	Denaturierung	30 sec	94°C
	Annealing	30 sec	primerabhängig
	Elongation	1 min/kb	72°C
3		10 min	72°C
4		forever	4°C

**Tab. 21: PCR-Primer zur Amplifikation kleiner Fragmente.**

<b>Konstrukt</b>	<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>	<b>Bandengröße</b>
pThTPH1 RPA-Sonde	TPH15	cac tca ata tg tga gac aca g	304 bp
	TPH13	ggc ttt act ttg gca tgt cc	
pThTPH2 RPA-Sonde	hTPH25	acc cag tac atc cgg cat g	304 bp
	TPH23	gct ttc aca cat gcc ttg tc	
pTmTPH1 RPA-Sonde	TPH15	cac tca ata tg tga gac aca g	305 bp
	TPH13	ggc ttt act ttg gca tgt cc	
pTmTPH2 RPA-Sonde	rTPH25	cga tct ggc ttc aca gtg ag	391 bp
	TPH23	gct ttc aca cat gcc ttg tc	
pTrTPH1 RPA-Sonde	TPH15	cac tca ata tg tga gac aca g	305 bp
	TPH13	ggc ttt act ttg gca tgt cc	
pTrTPH2 RPA-Sonde	rTPH25a	act tgg ggt gtt gtg ttt cg	501 bp
	rTPH23a	cga tgg agg aaa gta acc ctg	
pThGAPDH RPA-Sonde	hGAPDH for	tgg act cca cga cgt act cag	89 bp
	hGAPDH rev	tca atg gaa atc cca tca cca tc	
pTeasyhSERT RPA-Sonde	hSERT for	gtc aag acc tct gg caa ggt g	335 bp
	hSERT rev	aac cga gca ctg tga aga tga c	
pTeasyhNAT RPA-Sonde	hNAT for	gac tca tgc agg agt cac tga c	276 bp
	hNAT rev	gag cag tgg agc tcc atg aag	
pTeasyhMAO-A RPA-Sonde	hMAO-A for	gaa gga gat tcc aac tga tgc ac	242 bp
	hMAO-A rev	ctg gcc acc att ggt gac aga g	
pTeasyhTG2 RPA-Sonde	hTG2 for	gtg tag aca gtc tca cct tca g	298 bp
	hTG2 rev	gta cac agc atc cgc tgg gca c	
pTeasyhVMAT1 RPA-Sonde	hVMAT1 for	cca aca gga ttg gat atc ata tc	276 bp
	hVMAT2 rev	act cgt aca tta cac ttc caa ag	
pTeasyhVMAT2 RPA-Sonde	hVMAT2 for	ctg acc aac aga att ggc tat c	286 bp
	hVMAT2 rev	cac aaa ctc ata gag cac act c	
pTeasymGAPDH RPA-Sonde	mGAPDH for	cca gta tga ctc cac tca cg	134 bp
	mGAPDH rev	cat act cag cac cgg cct c	
pTeasymAAAD RPA-Sonde	mAAAD for	atg cca ggg gtg aca cac tg	252 bp
	mAAAD rev	cac ttc cct gga tca ctc ctc	
Nachweis hTPH1	TPH1for	cac tca ata tg tga gac aca g	304 bp
	TPH1rev	ggc ttt act ttg gca tgt cc	
Nachweis hTPH2	hTPH2for	acc cag tac atc cgg cat g	304 bp
	TPH2rev	gct ttc aca cat gcc ttg tc	
Nachweis mTPH1	TPH1for	cac tca ata tg tga gac aca g	305 bp
	TPH1rev	ggc ttt act ttg gca tgt cc	
Nachweis mTPH2	m,rTPH2vor	cga tct ggc ttc aca gtg ag	391 bp
	TPH2rev	gct ttc aca cat gcc ttg tc	
Nachweis rTPH1	TPH1for	cac tca ata tg tga gac aca g	305 bp
	TPH1rev	ggc ttt act ttg gca tgt cc	
Nachweis rTPH2	m,rTPH2for	cga tct ggc ttc aca gtg ag	501 bp
	TPH2rev	gct ttc aca cat gcc ttg tc	
Nachweis rTPH2 0er Einschub	rTPH2splice1	cga aat ctt cgt gga ctg tg	138 bp
	rTPH2splice2	ggc aca tcc tct agt tct tc	



Nachweis rTPH2 6er	rTPH2splice1	cga aat ctt cgt gga ctg tg	144 bp
Einschub	rTPH2splice3	gca cat cct cta gtc ctt g	
Nachweis rTPH2 0er, 3er, 6er	rTPH2splice4	acc att gtg acg ctg aat cc	96, 93, 90, 87 bp
und 9er Einschub	rTPH2splice5	aga gat ctt ccg agg gaa cc	

### 2.2.1.10.3 PCR zur Klonierung großer Fragmente (Long Range PCR)

Um längere DNA-Stücken zu amplifizieren, die anschließend in Expressionvektoren eingebracht werden sollten, wurde das Expand™ Long Template PCR System verwendet, welches DNA-Polymerasen mit proof-reading-Aktivität enthält. Es wurde hierbei nach der beigefügten Vorschrift gearbeitet. Als Templates der PCRs dienten die full-length Konstrukte der jeweiligen cDNAs in pGEM®-T bzw. pGEM®-Teasy Vektoren oder ihre reine cDNA.

**Tab. 22: Reaktionsansatz für Long Range PCR.**

Komponente	Volumen
DNA (100 ng/μl)	5 μl
Puffer 2 (10 x)	5 μl
dNTPs (10 mM)	2 μl
Primer for (10 μM)	1 μl
Primer rev (10 μM)	1 μl
Enzym-Mix (5 u/μl)	0.75 μl
ddH <sub>2</sub> O	35.75 μl

**Tab. 23: PCR-Programm für Long Range PCR.**

Schritt	Bezeichnung	Zeit	Temperatur
1	Denaturierung	2 min	95°C
2 x 34	Denaturierung	45 sec	94°C
	Annealing	30 sec	primerabhängig
	Elongation	1 min/kb	68°C
3		10 min	68°C
4		forever	4°C

**Tab. 24: PCR-Primer für Long Range PCR.**

Konstrukt	Primer	Sequenz 5'→3'
pCDNA3.1 hTPH1 full-length	h1NheIfor	aaa gct agc aat gat tga aga caa taa gga gaa c
	h1KpnIrev	aaa ggt acc cga att gat gct caa atg ttc c
pCDNA3.1 hTPH2 full-length	h2XhoIfor	aaa ctc gag atg cag cca gca atg atg atg
	h2CTApaIrev	aaa ggg ccc tca aat ccc cag ata ttg gtt c
pCDNA3.1 hTPH1-2	h2NheIfor	aaa gct agc atg cag cca gca atg atg atg
	h2HindIIIrev	aaa aag ctta ttt ttg cca gag tta ggt tta tt

	h1HindIIIfor	aaa aag ctt atg att gaa gac aat aag gag aac
	h1KpnIrev	aaa ggt acc cga att gat gct caa atg ttc c
pCDNA3.1 hTPH2ΔN44	h2dN44XhoIfor	aaa ctc gag atg gac gac aaa ggc aac aag gg
	h2CTApaIrev	aaa ggg ccc tca aat ccc cag ata ttg gtt c
pCDNA3.1 hTPH2ΔC17	h2XhoIfor	aaa ctc gag atg cag cca gca atg atg atg
	h2ΔC17ApaIrev	aaa ggg ccc tca gtc gct gcg aag gtc ctg
pCDNA3.1 hTPH2ΔC19	h2XhoIfor	aaa ctc gag atg cag cca gca atg atg atg
	h2ΔC19AparIrev	aaa ggg ccc tca gcg aag gtc ctg cac cac
pCDNA3.1 hTPH2ΔC51	h2NheIfor	aaa gct agc atg cag cca gca atg atg atg
	h2ΔC51KpnIrev	aaa ggt acc tta aat tga ctt tgc aaa gtc cct c
pCDNA3.1	h2dN44XhoIfor	aaa ctc gag atg gac gac aaa ggc aac aag gg
hTPH2ΔN44ΔC51	h2ΔC51Aparev	aaa ggg ccc tca aat tga ctt tgc aaa gtc cct c
pcDNA3.1 hTPH1 myc	h1mycXhoIfor	aaa ctc gag atg gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg atg att gaa gac aat
full-length		aag gag aac
	h1CTApaIrev	aaa ggg ccc tta gat act cgg ctt cct gct g
pcDNA3.1 hTPH1 FLAG	h1FLAGXhoIfor	aaa ctc gag atg gat tac aag gat gac gac gat aag atg att gaa gac aat aag gag
full-length		aac
	h1CTApaIrev	aaa ggg ccc tta gat act cgg ctt cct gct g
pcDNA3.1 hTPH2 myc	h2mycXhoIfor	aaa ctc gag atg gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg atg cag cca gca atg
full-length		atg atg
	h2CTApaIrev	aaa ggg ccc tca aat ccc cag ata ttg gtt c
pcDNA3.1 hTPH2 FLAG	h2FLAGXhoIfor	aaa ctc gag atg gat tac aag gat gac gac gat aag atg cag cca gca atg atg atg
full-length		
	h2CTApaIrev	aaa ggg ccc tca aat ccc cag ata ttg gtt c
pcDNA3.1 hTPH2 myc	h2mycXhoIfor	aaa ctc gag atg gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg atg cag cca gca atg
ΔC17		atg atg
	h2ΔC17ApaIrev	aaa ggg ccc tca gtc gct gcg aag gtc ctg
pcDNA3.1 hTPH2 FLAG	h2FLAGXhoIfor	aaa ctc gag atg gat tac aag gat gac gac gat aag atg cag cca gca atg atg atg
ΔC17		
	h2ΔC17ApaIrev	aaa ggg ccc tca gtc gct gcg aag gtc ctg
pcDNA3.1 hTPH2 myc	h2mycXhoIfor	aaa ctc gag atg gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg atg cag cca gca atg
ΔC19		atg atg
	h2ΔC19AparIrev	aaa ggg ccc tca gcg aag gtc ctg cac cac
pcDNA3.1 hTPH2 FLAG	h2FLAGXhoIfor	aaa ctc gag atg gat tac aag gat gac gac gat aag atg cag cca gca atg atg atg
ΔC19		
	h2ΔC19AparIrev	aaa ggg ccc tca gcg aag gtc ctg cac cac
pcDNA3.1 hTPH2 myc	h2mycXhoIfor	aaa ctc gag atg gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg atg cag cca gca atg
ΔC51		atg atg
	h2ΔC51Aparev	aaa ggg ccc tca aat tga ctt tgc aaa gtc cct c
pcDNA3.1 hTPH2 FLAG	h2FLAGXhoIfor	aaa ctc gag atg gat tac aag gat gac gac gat aag atg cag cca gca atg atg atg
ΔC51		
	h2ΔC51Aparev	aaa ggg ccc tca aat tga ctt tgc aaa gtc cct c
pBTM hTPH2 part1	Y2H part1 for	cta aag tcg acc atg cag cca gca atg atg atg ttt tcc ag
	Y2H part1 rev	agg cgg ccg cta att ttt gcc aga gtt agg ttt att tag tgt
pBTM hTPH2 part2	Y2H part2 for	cta aag tcg act gac gac aaa ggc aac aag gga agc agc aaa c
	Y2H part2 rev	agg cgg ccg cta ttc ctc tgt cca aat gtt ctc tgg agg att c

pBTM hTPH2 part3	Y2H part3 for	cta aag tcg aca gaa gag cta gag gat gtg ccc tgg ttc cct
	Y2H part3 rev	agg cgg ccg cta tac tga gaa ggg acg ggt aat tga ctt tgc
pBTM hTPH2 part4	Y2H part4 for	cta aag tcg aca tac ttc aat ccc tac aca cag agt att gaa
	Y2H part4 rev	agg cgg ccg cca tca aat ccc cag ata ttg gtt cat ttt g
pBTM hTPH2 part1-4	Y2H part1 for	cta aag tcg acc atg cag cca gca atg atg atg ttt tcc ag
	Y2H part4 rev	agg cgg ccg cca tca aat ccc cag ata ttg gtt cat ttt g
pBTM hTPH2 part1-3	Y2H part1 for	cta aag tcg acc atg cag cca gca atg atg atg ttt tcc ag
	Y2H part3 rev	agg cgg ccg cta tac tga gaa ggg acg ggt aat tga ctt tgc
pBTM hTPH2 part1-2	Y2H part1 for	cta aag tcg acc atg cag cca gca atg atg atg ttt tcc ag
	Y2H part2 rev	agg cgg ccg cta ttc ctc tgt cca aat gtt ctc tgg agg att c
pBTM hTPH2 part2-3	Y2H part2 for	cta aag tcg act gac gac aaa ggc aac aag gga agc agc aaa c
	Y2H part3 rev	agg cgg ccg cta tac tga gaa ggg acg ggt aat tga ctt tgc
pBTM hTPH2 part2-4	Y2H part2 for	cta aag tcg act gac gac aaa ggc aac aag gga agc agc aaa c
	Y2H part4 rev	agg cgg ccg cca tca aat ccc cag ata ttg gtt cat ttt g
pBTM hTPH2 part3-4	Y2H part3 for	cta aag tcg aca gaa gag cta gag gat gtg ccc tgg ttc cct
	Y2H part4 rev	agg cgg ccg cca tca aat ccc cag ata ttg gtt cat ttt g
pGAD hTPH2 part1	Y2H part1 for	cta aag tcg acc atg cag cca gca atg atg atg ttt tcc ag
	Y2H part1 rev	agg cgg ccg cta att ttt gcc aga gtt agg ttt att tag tgt
pGAD hTPH2 part2	Y2H part2 for	cta aag tcg act gac gac aaa ggc aac aag gga agc agc aaa c
	Y2H part2 rev	agg cgg ccg cta ttc ctc tgt cca aat gtt ctc tgg agg att c
pGAD hTPH2 part3	Y2H part3 for	cta aag tcg aca gaa gag cta gag gat gtg ccc tgg ttc cct
	Y2H part3 rev	agg cgg ccg cta tac tga gaa ggg acg ggt aat tga ctt tgc
pGAD hTPH2 part4	Y2H part4 for	cta aag tcg aca tac ttc aat ccc tac aca cag agt att gaa
	Y2H part4 rev	agg cgg ccg cca tca aat ccc cag ata ttg gtt cat ttt g
pGAD hTPH2 part1-4	Y2H part1 for	cta aag tcg acc atg cag cca gca atg atg atg ttt tcc ag
	Y2H part4 rev	agg cgg ccg cca tca aat ccc cag ata ttg gtt cat ttt g
pGAD hTPH2 part1-3	Y2H part1 for	cta aag tcg acc atg cag cca gca atg atg atg ttt tcc ag
	Y2H part3 rev	agg cgg ccg cta tac tga gaa ggg acg ggt aat tga ctt tgc
pGAD hTPH2 part1-2	Y2H part1 for	cta aag tcg acc atg cag cca gca atg atg atg ttt tcc ag
	Y2H part2 rev	agg cgg ccg cta ttc ctc tgt cca aat gtt ctc tgg agg att c
pGAD hTPH2 part2-3	Y2H part2 for	cta aag tcg act gac gac aaa ggc aac aag gga agc agc aaa c
	Y2H part3 rev	agg cgg ccg cta tac tga gaa ggg acg ggt aat tga ctt tgc
pGAD hTPH2 part2-4	Y2H part2 for	cta aag tcg act gac gac aaa ggc aac aag gga agc agc aaa c
	Y2H part4 rev	agg cgg ccg cca tca aat ccc cag ata ttg gtt cat ttt g
pGAD hTPH2 part3-4	Y2H part3 for	cta aag tcg aca gaa gag cta gag gat gtg ccc tgg ttc cct
	Y2H part4 rev	agg cgg ccg cca tca aat ccc cag ata ttg gtt cat ttt g

---

#### 2.2.1.10.4 Gerichtete Mutagenese

Für die gerichtete Mutagenese wurde das QuickChange® II Site-directed Mutagenesis Kit nach den Angaben des Herstellers genutzt.

**Tab. 25: Reaktionsansatz für Mutagenese-PCR.**

Komponente	Volumen
DNA (10 ng/μl)	5 μl
Puffer (10 x)	5 μl
dNTPs Mix	1 μl
Primer for (100 ng/μl)	1.25 μl
Primer rev (100 ng/μl)	1.25 μl
PfuUltra HF DNA-Polymerase (2.5 u/μl)	1 μl
ddH <sub>2</sub> O	35.5 μl

**Tab. 26: PCR-Programm für Mutagenese.**

Schritt	Bezeichnung	Zeit	Temperatur
1	Denaturierung	5 min	95°C
2 x 16	Denaturierung	30 sec	95°C
	Annealing	30 sec	55°C
	Elongation	1 min/kb	68°C

**Tab. 27: Mutageneseprimer.**

Konstrukt	Primerbezeichnung	Sequenz 5'→3'
pCDNA3.1 hTPH2 S9A	Ser9-Ala9 for	gca atg atg atg ttt gca agt aaa tac tgg gc
	Ser9-Ala9 rev	gc cca gta ttt act tgc aaa cat cat cat tgc
pCDNA3.1 hTPH2 S9E	Ser9-Glu9 for	gca atg atg atg ttt gag agt aaa tac tgg gc
	Ser9-Glu9 rev	gc cca gta ttt act ctc aaa cat cat cat tgc
pCDNA3.1 hTPH2 S10A	Ser10-Ala10 for	g atg atg ttt tcc gct aaa tac tgg gca cgg
	Ser10-Ala10 rev	ccg tgc cca gta ttt agc gga aaa cat cat c
pCDNA3.1 hTPH2 S10E	Ser10-Glu10 for	g atg atg ttt tcc gag aaa tac tgg gca cgg
	Ser10-Glu10 rev	ccg tgc cca gta ttt ctc gga aaa cat cat c
pCDNA3.1 hTPH2 S19A	Ser19-Ala19 for	gca cgg aga ggg ttt gcc ctg gat tca gca gtg c
	Ser19-Ala19 rev	g cac tgc tga atc cag ggc aaa ccc tct ccg tgc
pCDNA3.1 hTPH2 S19E	Ser19-Glu19 for	gca cgg aga ggg ttt gag ctg gat tca gca gtg c
	Ser19-Glu19 rev	g cac tgc tga atc cag ctc aaa ccc tct ccg tgc
pCDNA3.1 hTPH2 S22A	Ser22-Ala22 for	gg ttt tcc ctg gat gca gca gtg ccc gaa gag c
	Ser22-Ala22 rev	g ctc ttc ggg cac tgc tgc atc cag gga aaa cc
pCDNA3.1 hTPH2 S22E	Ser22-Glu22 for	gg ttt tcc ctg gat gaa gca gtg ccc gaa gag c
	Ser22-Glu22 rev	g ctc ttc ggg cac tgc ttc atc cag gga aaa cc
pCDNA3.1 hTPH2 T35A	Thr35-Ala35 for	g cta ctt ggc agc tca gca cta aat aaa cct aac tct gg
	Thr35-Ala35 rev	cc aga gtt agg ttt att tag tgc tga gct gcc aag tag c
pCDNA3.1 hTPH2 T35E	Thr35-Glu35 for	g cta ctt ggc agc tca gaa cta aat aaa cct aac tct gg
	Thr35-Glu35 rev	cc aga gtt agg ttt att tag ttc tga gct gcc aag tag c
pCDNA3.1 hTPH2 S104A	Ser104-Ala104 for	cct gcg aag aag tgc gga ggt tga aat c
	Ser104-Ala104 rev	gat ttc aac ctc cgc act tct tcg cga g

pCDNA3.1 hTPH2 S104E	Ser104-Glu104 for	ctc gcg aag aag tga gga ggt tga aat c
	Ser104-Glu104 rev	gat ttc aac ctc ctc act tct tcg cga g
pCDNA3.1 hTPH2 S306A	Ser306-Ala306 for	cat ccg gca tgg cgc gga tcc cct cta cac c
	Ser306-Ala306 for	ggg gta gag ggg atc cgc gcc atg ccg gat g
pCDNA3.1 hTPH2 S306E	Ser306-Glu306 for	cat ccg gca tgg cga gga tcc cct cta cac c
	Ser306-Glu306 rev	ggg gta gag ggg atc ctc gcc atg ccg gat g

---

Nach Abschluss der PCR wurde das Produkt für 1 h bei 37°C mit 0.2 u/µl DpnI verdaut, einer Endonuklease, welche die ursprüngliche, methylierte Plasmid-DNA verdaut. Die neue, unmethylierte, die Mutation tragende DNA bleibt intakt.

Anschließend wurden die im Kit enthaltenen ultrakompetenten Zellen mit 1 µl der DpnI behandelten DNA transfiziert und auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Die Plasmid-DNA der gewachsenen Klone wurde isoliert und sequenziert.

#### 2.2.1.11 RACE-PCR

Für die RACE-PCR zur Amplifikation von Fragmenten mit unbekannten Sequenzen am 3'- oder 5'-Ende wurde das FirstChoice™RML-RACE Kit gemäß der Herstellerangaben genutzt.

#### 2.2.1.12 Ribonuklease-Protection-Assay

Der RPA ermöglicht den quantitativen Vergleich bzw. den Nachweis einer bestimmten mRNA in Gewebe- oder Zellhomogenaten. Der Nachweis basiert darauf, dass eine radioaktiv gelabelte antisense Sonde hergestellt wird, die exakt zur nachzuweisenden RNA passt. Die Sonde sollte eine Länge zwischen 200 und 400 Basen besitzen. Die Sonde wird zusammen mit dem unbekannten RNA Mix über Nacht inkubiert. Befindet sich die zur Sonde komplementäre RNA in dem Gemisch, kommt es zur Hybridisierung und Bildung von dsRNA. Anschließend wird das RNA Gemisch mit einer einzelstrangspezifischen RNase behandelt. Hierbei wird jede ssRNA abgebaut – also auch die ungebundene Sonde – und lediglich die hybridisierten RNAs sind aufgrund ihres Doppelstrangcharakters geschützt (protektiert). Die mit RNase behandelte RNA wird anschließend gefällt, denaturiert und in einem Harnstoffgel aufgetrennt. Mittels Autoradiografie werden die unverdauten Sondenmoleküle nachgewiesen, die durch die Bindung an ihre Partner-RNA geschützt waren. Die Stärke ihres Radiographiesignals ist also direkt proportional zur Menge der ursprünglich im Gemisch enthaltenen Ziel-RNA. Für die RPAs wurde der RPA-Kit II genutzt.

Als Kontrollen werden bei einem RPA immer eine Y<sup>+</sup>- und ein Y<sup>-</sup>-Probe mitgeführt. Sie enthalten jeweils eine den Proben gleiche Yeast-RNA-Menge. Die Y<sup>-</sup>-Probe wird nicht mit RNaseATI verdaut. Sie enthält also am Ende des RPA die unverdaute Sonde und ist somit eine

Kontrolle für Sondenzustand und -größe. Die Y<sup>+</sup>-Probe hingegen sollte theoretisch keine Homologien zur nachzuweisenden RNA aufweisen. Hier erwartet man am Ende der RPA eine komplett verdaute Sonde und damit eine leere Spur auf dem Gel. Die Y<sup>+</sup>-Probe ist also eine Kontrolle für die Wirksamkeit des RNase Verdaus.

#### 2.2.1.12.1 Vorbereitung der RNA

10-40 µg der RNA Probe wurden jeweils in ein Tube pipettiert und mit einer SpeedVac lyophilisiert. Die so vorbereitete RNA wurde entweder sofort für die Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C eingelagert.

#### 2.2.1.12.2 Sondenherstellung

Mittels spezifischer Primer und Nutzung der PCR wurde zunächst ein zwischen 200 und 400 bp langes Fragment der cDNA der interessanten RNA amplifiziert. Dieses wurde in den pGEM®-T oder pGEM®-Teasy Vektor ligiert und sequenziert. Je nach Orientierung des Inserts wurde der T-Vektor anschließend mit Hilfe eines passenden Restriktionsenzym geöffnet. Hierzu wurden 10 µg DNA mit 5 µl Enzym und 5 µl passendem 10 x Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl über Nacht bei 37°C verdaut. Das Enzym wurde anschließend 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert und der Ansatz 20 min dialysiert. Der geöffnete Vektor hatte somit eine Endkonzentration von 200 ng/µl.

500-1000 ng des geöffneten Sondenvektors wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl 1 h bei 37°C zusammen mit den Ribonukleotiden ATP, GTP und CTP (0.4 mM) und dem radioaktiven [ $\alpha$ -32P] UTP (2 mM) inkubiert. Ferner befanden sich RNA-Polymerasepuffer, DTT (4 mM), RNasin (2 u/µl) und die jeweilige RNA-Polymerase (SP6 oder T7 mit 4 bzw. 1 u/µl) in dem Ansatz. Es folgte ein Verdau mit 0.1 u/µl DNaseI für 30 min. Die so entstandenen Sondenmoleküle wurden mit Hilfe der QuickSpin Columns for radiolabeled DNA purification entsprechend der Herstellerhinweise von freien Nukleotiden gereinigt. Zur Kontrolle der Sonden wurden 2 µl der gereinigten Sonde zusammen mit 7 µl Loadingbuffer auf ein Harnstoffgel aufgetragen. Der Gellauf wurde mit einer Spannung von 250 V gestartet und diese später auf 300 V erhöht. Als Laufpuffer diente TBE. Die Sondenaktivität in cpm/µl wurde mit Hilfe eines Szintillators bestimmt.

<b>Harnstoffgel</b>	Harnstoff	9 M	7 M
	10 x TBE		1 x
	Acrylamid-/Bis-Acrylamid	19:1	5 % (v/v)
	APS		0.0008 % (v/v)
	TEMED		0.001 % (v/v)

#### 2.2.1.12.3 Hybridisierung

Zu den eingeeengten RNA-Proben wurden jeweils 20 µl Hybridisierungspuffer gegeben. Der Puffer enthielt 20.000-40.000 cpm der spezifischen RNA-Sonde und je nach Versuchsaufbau zusätzlich 2500-20.000 cpm einer  $\beta$ -Actin- oder GAPDH-Sonde. Die RNA und das Sondengemisch wurden gut gemischt und zur Entfernung von eventuell ausgebildeten Sekundärstrukturen 5 min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für 12-18 h in einem Hybridisierungssofen.

#### 2.2.1.12.4 Aufarbeitung

Nach Ablauf der Hybridisierungszeit wurden die nicht hybridisierten Sondenmoleküle und RNAs mit 200 µl Digestionbuffer und 2.5 µl RNaseATI 1 h bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der RNase und die gleichzeitige RNA-Fällung mit 300 µl des Inactivationmix für 20 min bei -20°C. Die RNA wurde anschließend pelletiert (13.000 g, 20 min, 4°C) und vollständig vom Überstand befreit. Die entstehenden Pellets wurden in 8 µl Loading Buffer aufgenommen und auf ein Harnstoffgel aufgetragen. Das Gel wurde mit 250 V gestartet und dann später 90 min bei 300 V gefahren. Als Laufpuffer diente wiederum TBE. Danach wurde das Gel auf Whatmanpapier überführt und 2 h bei 80°C auf einem Vakuumgeltrockner getrocknet. Anschließend wurde für 4 - 48 h eine Phosphorimagerplatte aufgelegt, welche die Autoradiografie des Gels festhielt. Die Platte wurde abschließend in einen Phosphorimager eingelesen.

### 2.2.2 Proteinbiochemie

#### 2.2.2.1 *Isolierung von Proteinen aus Zellen*

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Ernte durch Abschaben in eiskaltem PBS mit anschließender Zentrifugation (2500 g; 2 min; 4°C). Das Pellet wurde in Protein-Lysispuffer aufgenommen, resuspendiert, 10 min auf Eis gelagert und 10 sec Ultraschallbehandlung ausgesetzt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (13.000 g, 15 min, 4°C) und der Überstand entweder sofort mit Roti®-Load SDS-Ladepuffer versetzt und in die SDS-PAGE eingesetzt, bei -80°C gelagert.

<b>PBS</b>	NaCl	137 mM
	KCl	2.7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.0 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM
	pH 7.5	

<b>Protein-Lysis-Puffer</b>	Tris-HCl pH 7.4	20 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Triton X-100	0.5 %
	PMSF	1 mM
	Complete Protease Inhibitor	1 Tablette/10 ml
	Cocktail	

#### 2.2.2.2 Isolierung von Proteinen aus Geweben

Organe wurden mit Hilfe eines Potter-Homogenisators in 1 ml 1 x CellSignaling Zelllysispuffer (mit 1 mM PMSF und Complete Protease Inhibitor Cocktail) je 100 mg Gewebe homogenisiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert, 30 sec ultraschallbehandelt und zentrifugiert (13.000 g, 20 min, 4°C). Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde fotometrisch mit der Bradford-Methode bestimmt. Es wurden Aliquots mit 30 µg Gesamtprotein angelegt, mit Roti®-Load SDS-Ladepuffer versetzt, bei -80°C eingelagert oder direkt bei der SDS-PAGE eingesetzt.

#### 2.2.2.3 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation wurde mit Hilfe des ProFound™ Mammalian c-Myc Tag IP/Co-IP Application Set durchgeführt. Zunächst wurden COS7 Zellen mit den jeweiligen myc- und FLAG-Epitop gelabelten Konstrukten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Proteine mit dem kriteigenen Lysispuffer lysiert, zentrifugiert (13.000 g, 20 min, 4°C) und die proteinhaltigen Überstände in neue Tubes überführt. 30 µl dieser Überstände wurden abgenommen, bei -80°C aufbewahrt und später bei der SDS-PAGE als Expressionskontrolle verwendet. Die restlichen Lysate wurden entsprechend der Fragestellung gemischt und für 4 h zusammen mit den myc-Beads auf einem Test-Tube Rotator bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Beads 3-mal mit Waschpuffer gewaschen, in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Der resultierende Überstand wurde mit 3 µl 1M DTT und IP-Ladepuffer versetzt und bei der SDS-PAGE eingesetzt.

Die SDS-PAGE wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zum Nachweis der Protein-Protein-Interaktion wurden anti-FLAG-Antikörper verwendet. Das Vorhandensein der exprimierten Proteine wurde in den reinen Lysaten mit anti-myc und anti-FLAG-Antikörpern überprüft.



#### *2.2.2.4 Phosphorylierung von Proteinen mittels Proteinkinase A*

Die mit einem myc-HIS-Epitop gelabelten Proteinen wurden in transient transfizierten COS7 Zellen exprimiert und wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben mit Hilfe des ProFound™ Mammalian c-Myc Tag IP/Co-IP Application Set aus dem Zellysat aufgereinigt. Die so aufkonzentrierten Proteine wurden dann im beagebundenen Zustand in 20 µl Reaktionsansatz mit 1 µg PKA, 10 mM Tris (pH 7.0), 2 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Beads 2-mal mit TBS gewaschen und in 25 µl SDS-Probenpuffer aus dem ProFound™ Mammalian c-Myc Tag IP/Co-IP Application Set aufgenommen. Das Ganze wurde 3 min bei 95°C aufgekocht, der Überstand mit 100 mM DTT versetzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel auf Whatmanpapier überführt und für 30 min bei 80°C auf einem Vakuumgeltrockner getrocknet. Danach wurde für 2-10 min eine Phosphoimagerplatte aufgelegt, welche die Autoradiografie des Gels festhielt. Die Platte wurde anschließend in einen Phosphoimager eingelesen und die Graustufeninformationen der entstandenen Banden mit Hilfe des Programms TINA ausgewertet.

#### *2.2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode*

Die Gesamtproteinmenge der Lysate wurde mit der Bradfordmethode bestimmt. Hierzu wurde bei jeder Messung eine Standardkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen im jeweilig verwendeten Lysispuffer der Proben mitgeführt. Dabei wurden 10 Werte von 0.1-2.5 µg BSA/µl verwendet. Die Proben wurden wenn nötig verdünnt, um innerhalb des Konzentrationsbereiches der Standardreihe zu liegen. Für die eigentliche Messung wurden je 5 µl Probe bzw. BSA-Standard mit 250 µl Bradfordreagenz gemischt und 10 min bei RT inkubiert. 100 µl hiervon wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und in einem 96-Well-Photometer bei 595 nm vermessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde unter Nutzung der Standardgerade bestimmt.

#### *2.2.2.6 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Für die Auftrennung mit Hilfe der SDS-PAGE, wurden die mit Roti®-Load SDS-Ladepuffer versetzten Proben zunächst 5 min bei 95°C denaturiert.

Die zur Auftrennung verwendeten Trenngele hatten üblicherweise eine Konzentration von 10 % Acrylamid-/Bisacrylamid 37,5:1 in 375 mM Tris pH 8.8. Die Sammelgele waren 5 %ig in 125 mM Tris pH 6.8.

Der Gellauf erfolgte zunächst bei 80 V für 15 min und anschließend bei 150 V für ca. 1 h in SDS-PAGE-Laufpuffer.

<b>SDS-PAGE-Laufpuffer</b>	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0.1 %

#### 2.2.2.7 Proteinnachweis mittels Coomassie Färbung

Um überexprimierte Proteine aus dem Lysat von Bakterien nachzuweisen, wurden diese zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 30 min auf einer Schwenkplattform in Coomassie-Färbelösung inkubiert, anschließend unter mehrmaligem Lösungswechsel für 1 h in Coomassie-Entfärbelösung geschwenkt und letztendlich in ddH<sub>2</sub>O überführt.

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	Coomassie Brilliant Blue R250	0.025 %
	Methanol	40 %
	Essigsäure	7 %
<b>Coomassie-Entfärbelösung</b>	Methanol	40 %
	Essigsäure	7 %

#### 2.2.2.8 Blotten von Proteinen

Zum Blotten wurden Nitrozellulosemembranen genutzt. Diese wurden zuvor jeweils 10 min in ddH<sub>2</sub>O und Transferpuffer inkubiert. Geblottet wurde in einer eisgekühlten Tankblotvorrichtung für 2 h bei 100 V.

<b>Transferpuffer</b>	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	Methanol	20 %

#### 2.2.2.9 Blocken von Membranen

Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen nach dem Blotten kurz in ddH<sub>2</sub>O gespült und anschließend je nach verwendetem Antikörper für 1 h bei RT in TBS, TBST oder PBST mit 5 % Milchpulver oder in Roti-Block auf einem Roller Mixer inkubiert.

<b>TBS</b>	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7.5	
<b>PBST</b>	Tween20	0.5 %
	in PBS	

#### *2.2.2.10 Inkubation mit primären Antikörpern*

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte nach den Angaben des Herstellers entweder in Roti-Block, TBS, TBST oder PBST mit Milchpulver über Nacht bei 4°C oder 2 h bei RMT auf einem Roller Mixer. Anschließend wurden die Membranen 2- bis 4-mal für 5-10 min in TBS oder PBS mit oder ohne Tween gewaschen.

#### *2.2.2.11 Inkubation mit sekundären Antikörpern*

Die Inkubation mit dem sekundären meerrettichperoxidasekonjugierten Antikörper erfolgte in Roti-Block bzw. in TBS, TBST oder PBS mit Tween und 5 % Milchpulver für 1 h bei RT auf dem Roller Mixer. Anschließend wurde die Membran 2- bis 4-mal 5 min mit TBST oder PBST gewaschen.

<b>TBST</b>	Tween20	0.5 %
	in TBS	

#### *2.2.2.12 ECL-Reaktion*

Für die ECL-Reaktion wurde das SuperSignaling® West Dura Extended Duration Substrate nach den Angaben des Hersteller genutzt. Nach 5 min Inkubation mit dem Lumineszenzsubstrat wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm für 5 sec bis 1 h auf die Membran aufgelegt und anschließend entwickelt.

### 2.2.2.13 Immunhistochemie

Entnommene Organe wurden in Paraffin eingelegt und mit einem Microtom in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Vor der Antikörperinkubation mussten die Paraffinschnitte der jeweiligen Gewebe zunächst für 3 x 5 min in Xylol deparaffinisiert werden. Es schloss sich folgende Rehydrierungsreihe an:

3 x 5 min 100 % Ethanol

1 x 5 min 96 % Ethanol

1 x 5 min 70 % Ethanol

1 x 5 min 50 % Ethanol.

Anschließend wurden die Schnitte 5 min in TBS gwaschen. Falls als Reporterenzym die Meerrettichperoxidase (HRP) genutzt werden sollte, wurden die Schnitte nun für 30 min in 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in Methanol) inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken. Um das Gewebe proteolytisch aufzuschließen, schloss sich eine Trypsinbehandlung (0.1 % (w/v) in TBS) für 15 min bei 37°C und 15 min bei RMT an. Nach dem Waschen mit high salt (hs)TBS (3 x 5 min) wurde nach den Vorschriften und mit den Bestandteilen des VECTASTAIN® ABC-AP Kit bzw. R.T.U. VECTASTAIN® UniversalElite ABC Kit weitergearbeitet. Das Blocken erfolgte mit 10 % VECTASTAIN® Serum\* für 1 h bei RMT. Danach wurde der primäre Antikörper in 10 % VECTASTAIN® Serum\* in TBS für 1 h bei RMT bzw. über Nacht bei 4°C auf die Schnitte gegeben. Nach dem Waschen mit hsTBS (3 x 5 min) erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten sekundären VECTASTAIN® Antikörper in 10 % VECTASTAIN® Serum\* in TBS. Nach einem erneuten Waschschrift mit TBS (3 x 5 min) wurden die Objektträger für 30 min mit der VECTASTAIN® ABC-AP bzw. der R.T.U.Elite ABC Reagenz inkubiert. Nach 5minütigem Waschen in TBS erfolgte die Inkubation mit der Alkalischen Phosphatase Substratlösung (VECTOR® Red - Alkaline Phosphatase Substrate Kit) bzw. der Peroxidase Substratlösung (DAB Substrate - Peroxidase Substrate Kit) bis zum Eintreten der erwünschten Färbung.

<b>hsTBS</b>	Tris	50 mM
	NaCl	500 mM
	pH 7,5	

\* Es wurde immer das Serum derjenigen Spezies verwendet, in welcher der sekundäre Antikörper produziert worden war.

#### *2.2.2.14 Immuncytochemie*

Für die spätere Analyse mittels Immuncytochemie wurden die Zellen in Chamber Slides ausgesät und mittels Lipofectamine2000 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 15 min bei RT in 3 %igem PFA in PBS fixiert. Danach wurden sie zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 10 min mit 0.25 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Es schlossen sich drei Waschschrte für 5 min in PBS an. Zum Blocken wurden die Zellen nun 30 min in 10 % Serum\* in PBST inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in 5 % Serum\* in PBST in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C. Nach 3-maligem Waschen mit PBS (je 5 min) konnte nun die Behandlung mit dem sekundären Antikörper in 5 % Serum\* in PBST für 1 h bei RT erfolgen. Am Ende erfolgte eine Anfärbung der Zellkerne für 1 min mit DAPI (1µg/µl) und die Einbettung mit Fluoreszenzeinbettungsmedium.

\* Es wurde immer das Serum derjenigen Spezies verwendet, in welcher der sekundäre Antikörper produziert worden war.

### **2.2.3 Bakterien**

#### *2.2.3.1 Bakterienstämme*

Für alle Versuche wurde ausschließlich der Escherichia coli Stamm DH5α genutzt.

#### *2.2.3.2 Transformation von Bakterien*

Für die Einbringung von Plasmid-DNA in Bakterien wurde die Methode der Elektroporation genutzt. Hierzu wurden je Ansatz 50 µl elektrokompente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Ligtationsansatz versetzt. Dieses Gemisch wurde in eine GenePulse® Elektroporationsküvette überführt und in einem Elektroporator für 5 msec einem Impuls von 1350 mV ausgesetzt. Daraufhin wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese 1 h bei 37°C angeschüttelt. Danach wurden 100 µl des Ansatzes auf einer antibiotikahaltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### *2.2.3.3 Vermehrung und Selektion von Bakterien*

##### 2.2.3.3.1 Vermehrung auf Platten

Um erfolgreich transformierte Bakterien zu selektieren, wurden die Transformationsansätze mit einem Drigalskispatel auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

<b>LB-Platten</b>	Baktoagar	10-15 %
	X-Gal	100 µg/ml
	IPTG	80 µg/ml
	Ampicillin oder Kanamycin	100 µg/ml
	in LB-Medium	

#### 2.2.3.3.2 Vermehrung in flüssigen Medien

Um Bakterien in Flüssigmedien zu vermehren, wurde entweder eine Bakterienkolonie von einer Platte in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt, oder 1 ml einer Flüssigkultur mit hoher optischer Dichte wurde in 250 ml LB-Medium gegeben und auf die gleiche Weise behandelt.

<b>LB-Medium</b>	Hefeextrakt	5 g
	Bactotrypton	10 g
	NaCl	10 g
	Ampicillin oder Kanamycin	100 µg/ml
	ad. 1000 ml H <sub>2</sub> O	

#### 2.2.3.4 *Überexpression von Proteinen in Bakterien*

Die Expressionskonstrukte wurden mit Hilfe der Elektroporation in die E.coli DH5α Zielzellen eingebracht. Von einer LB-Platte wurde am nächsten Tag eine Kolonie gepickt und über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Medium angeschüttelt. Am nächsten Morgen wurden je 2.5 ml der Kultur mit 2.5 ml frischem LB-Medium gemischt. Zu einem der Ansätze wurde zwecks Expressionsinduktion 1 mM IPTG gegeben, der andere Ansatz blieb als Kontrolle uninduziert. Die Ansätze wurden weitere 4 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien pelletiert (8000 g, 5 min, 4°C) und mit 600 µl PBS oder Lysispuffer aus dem ProFound™ Mammalian c-Myc Tag IP/Co-IP Application Set, 1 mM PMSF und Complete Protease Inhibitor Cocktail versetzt. Die Zelllyse erfolgte durch 2-mal 30 sec Ultraschallbehandlung. Nach anschließender Zentrifugation (16.000 g, 20 min, 4°C) wurde der Überstand bei -80°C eingefroren bzw. direkt für eine IP oder bei einer SDS-PAGE eingesetzt.

## 2.2.4 Zellkultur

### 2.2.4.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator mit wassergesättigter, 5 %iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Als Medien dienten in Tab. 28 angegebenen Standardmedien von Gibco (Paisley, Scotland, UK) mit 1000 u/µl Penicillin/Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FKS).

**Tab. 28: Zellkulturmedien.**

<b>Zelllinie</b>	<b>Medium</b>
COS7	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (4 mM L-Glutamin 1.5 g/l Natriumbicarbonat 4.5 g/l Glucose)
HEK293	Minimum essential medium (MEM) (2 mM L-Glutamin Earle's BSS 1.5 g/l Natriumbicarbonat 0.1 mM nichtessentielle Aminosäuren 1.0 mM Natriumpyruvate)
P815	DMEM (4 mM L-Glutamin 1.5 g/l Natriumbicarbonat 4.5 g/l Glucose)
TT	Ham's F12K Medium (2 mM L-Glutamin 1.5 g/l Natriumbicarbonat)

### 2.2.4.2 Aussaat eingefrorener Zellen

Eingefrorene Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, sofort in Medium aufgenommen und pelletiert (3 min, 800 g). Das Pellet wurde in 10 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und in eine 10 cm Schale ausgesät.

### 2.2.4.3 Mediumwechsel

Alle 2-3 Tage wurde das Medium der Zellen gewechselt. Das alte Medium wurde entfernt und durch 10 ml frisches Medium ersetzt.

#### 2.2.4.4 Passagieren von Zellen

Wenn die Zellen eine Konfluenz von 100 % erreicht hatten, wurde sie 2-mal mit 5 ml PBS gewaschen und ca. 5 min mit 500 µl Trypsin bei 37°C inkubiert.

Die gelösten Zellen wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:10 in 10 ml frischem Medium auf neue Zellkulturschalen verteilt.

#### 2.2.4.5 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Die Zellen wurden 2-mal mit 5 ml PBS gewaschen und ca. 5 min mit 500 µl Trypsin bei 37°C inkubiert. Danach wurden die vom Schalenboden gelösten Zellen im 5 ml Medium aufgenommen und pelletiert (3 min, 800 g). Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde in einem Cryo 1°C Freezing Container im Tiefkühler mit einer Kühlungsrate von 1°C/min auf -80°C abgekühlt und auch kurzfristig dort gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen bei -276°C in flüssigem Stickstoff untergebracht.

<b>Einfriermedium</b>	DMSO	10 %
	FKS	90 %

#### 2.2.4.6 Transfektion von Zellen

##### 2.2.4.6.1 Transfektion mittels Lipofectamine™2000

Bei der Transfektion wurde für die verschiedenen Zellkulturschalengrößen nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit serumhaltigen, antibiotikafreien Medium bei einer Anzahl von 150.000 Zellen/Well in 6-Well-Platten eingesät. Nach den Anweisungen des Herstellers wurden sie am nächsten Tag mit Lipofectamine™2000 und 4 µg DNA/Well transfiziert. 16 h nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch serum- und antibiotikahaltiges Medium ersetzt. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion.

#### 2.2.5 Tryptophanhydroxylase-Aktivitäts-Assay

Die Aktivität der Tryptophanhydroxylase in transfizierten oder nicht transfizierten Zellen wurde mit Hilfe eines in vitro Assays bestimmt. Dabei wurde die Akkumulation von 5-HTP im Zelllysats mit Hilfe einer HPLC Anlage bestimmt.

Die Zellen wurden mittels Lipofectamine™2000-Methode transient mit den betreffenden TPH-Konstrukten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde der Assay durchgeführt.



Für gewöhnlich wurde die Hälfte der Zellen einer Schale für den Assay verwendet. Die andere Hälfte diente zur Proteingewinnung und späteren Normierung der gemessenen 5-HTP-Werte auf die relative Menge an TPH-Enzym je Schale.

Zunächst wurden die Zellen einer zu 100 % konfluenten 10 cm Zellkulturschale zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie mit Hilfe eines Zellschabers vom Schalenboden gelöst und pelletiert (2500 g, 2 min, 4°C). Das Pellet wurde in 100-1000 µl Assaylysispuffer resuspendiert und die Zellen 30 sec mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Zelltrümmer kurz abzentrifugiert. Alle Schritte erfolgten bei 4°C. Das erhaltene Lysat wurde mit dem Präinkubationspuffer 10 min bei 30°C und leichtem Schütteln im Dunklen inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit dem eigentlichen Assaypuffer. Dieser Assaypuffer enthielt neben dem Substrat Trp und dem synthetischen Kofaktor 6MPH4 oder dem natürlichen Kofaktor BH4 auch NSD1015, einen Inhibitor der AAAD. Dieser Inhibitor sollte den weiteren Abbau des gebildeten 5-HTP zu 5-HT verhindern. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2.5 % (v/v) Perchloroessigsäure (PCA) gestoppt. Die Proteine und Zelltrümmer wurden anschließend pelletiert (20.000 g, 25 min, 4°C), der 5-HTP-haltige Überstand abgenommen und entweder direkt mit der HPLC Anlage vermessen oder bei -80°C eingelagert.

Der gleichzeitig geerntete zweite Teil der Zellen wurde bei einem Westernblot eingesetzt. Somit konnte durch quantitative Auswertung der Bandengrauwerte (TINA) der TPH-Gehalt der verschiedenen Proben miteinander verglichen werden und eine Normierung der im Assay gemessenen 5-HTP-Werte auf den relativen TPH-Gehalt der Zellen wurde möglich.

Für die Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetiken wurden die Trp-Konzentration bei konstanten 6MPH4 (250 µM) bzw. BH4 (300 µM) Konzentrationen variiert.

<b>Assaylysispuffer</b>	Tris-Acetat pH 6.8	75 mM
<b>Präinkubationspuffer</b>	Katalase	2 mg/ml
	DTT	25 mM
	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	100 µM
<b>Assaypuffer</b>	Tris-Acetat pH 6.4	15 mM
	Trp	10 – 6000 µM
	6MPH4/BH4	250/300 µM
	NSD1015	2 mM

## 2.2.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

### 2.2.6.1 Probenaufarbeitung für die HPLC

Die Proben wurden zur Deproteinierung mit Perchlorsäure (PCA) versetzt (Tab. 29) und mittels Ultraschall oder Ultra-Turrax aufgeschlossen. Die denaturierten und ausgefallenen Proteine wurden durch anschließende Zentrifugation (30 min, 20.000 g, 4°C) pelletiert. Die erhaltenen Überstände wurden mehrmals ohne das Pellet zu beschädigen auf- und abpipettiert, und in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Alle Schritte wurden strikt auf Eis ausgeführt. Bis zur Analyse im HPLC-System wurden die Überstände bei –80 °C gelagert.

**Tab. 29: Aufarbeitung der HPLC-Proben.**

<b>Probenart</b>	<b>PCA</b>	<b>Aufschluss</b>
Zellen	H <sub>2</sub> O mit 2,5 % PCA (70 %)	2 x 20 sec Ultraschall
Gewebe	1 ml H <sub>2</sub> O mit 2,5 % PCA (70%) je 100 mg Gewebe	2 x 15 sec Ultra-Turrax

### 2.2.6.2 5-HT-Detektion mittels HPLC

Die Detektion von 5-HT, 5-HTP und Trp erfolgte mit Hilfe der HPLC-Technik. Die aufgearbeiteten Proben wurden direkt oder bei Bedarf mit PCA-Wasser verdünnt in das HPLC-System injiziert. Als feste Phase diente eine C18 Protein und Peptid HPLC-Säule. Die Trennung erfolgte bei 20°C und mit einer Flussrate des HPLC-Puffers von 2 ml/min. Die Säuleneluate wurden kontinuierlich in dem angeschlossenen Fluoreszenzdetektor vermessen. Die Anregung der Tryptophanmetaboliten erfolgte bei 295 nm, die Emissionsmessung bei 345 nm. Aus den sich ergebenden Spektren wurden die Peakflächen der injizierten Substanzen ermittelt und durch Vergleich mit Standardkurven deren Konzentration in den Proben bestimmt.

<b>HPLC- Puffer</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
	Methanol	5 %

Die verwendete Shimadzu HPLC-Anlage setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- CBM-10A Communications Bus Module
- DGU-3A Degasser
- LC-10AD Liquid Chromatograph
- SIL-10A Auto Injector & Sample Cooler
- CTO-10AC Column Oven
- SPD-10AV UV-VIS Detector
- RF-10AXL Fluorescence Detector

Zur Steuerung der HPLC Anlage und zur Auswertung der Spektren wurde das Rechnerprogramm CLASS-LC10 (Shimadzu, Tokyo, J) verwendet.

### 2.2.7 Yeast-Two-Hybrid (Y2H) Screening

Dem Y2H-Screening lag das Prinzip des „Automatisierten Y2H interaction matings“ (Stelzl et al., 05) zugrunde. Es wurden zwei Vektoren zur Proteinexpression in Hefen genutzt: der pGAD426 und der pBTM117c (Abb. 14).

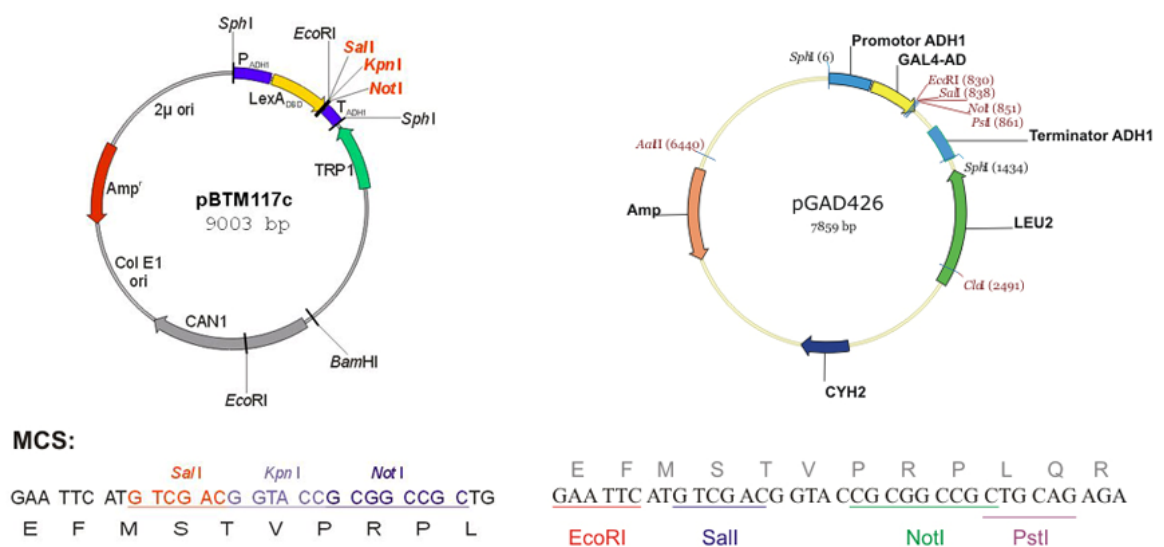


Abb. 14: pGAD426 und pBTM117c Vektoren für das Y2H-Screening.

Der pGAD246 trug die DNA-bindene Domäne (LexA), der pBTM17c die Aktivierungsdomäne (GAL4-AD). Die Interaktion beider Domänen führt in den verwendeten Hefestämmen zur Aktivierung dreier Reportergene: HIS3, URA3 und lacZ.

Für das Y2H-Screening stand eine Hefebibliothek mit nachweislich nicht autoaktivierenden 4456 humanen cDNAs in pGAD426 Vektoren und 5632 cDNAs in pBTM117c Vektoren zur

Verfügung. Die cDNAs in den Vektoren stammten ursprünglich aus der humanen, fötalen Hirn-cDNA Bibliothek hEX1 (Bussow et al., 98) bzw. von Klonen aus den Beständen des RZBP (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung) und kodierten zu 48 % full-length Open Reading Frames (ORFs) und zu 52 % die C-terminalen Fragmente längerer humaner Proteine. Die Prey-Vektoren (pGAD426 Vektoren und pBTM117c mit der cDNA Bibliothek) befanden sich in Hefen des Stammes L40ccU MAT $\alpha$  [MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2::(lexAop)4-HIS3 ura3::(lexAop)8-lacZ ADE2::(lexAop)8- URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2]. Als Baitvektoren dienten pGAD426 bzw. pBTM117c Vektoren mit denselben unterschiedlich langen Fragmenten der hTPH2 (Abb. 58). Die Baitvektoren wurden in den Hefestamm L40cc $\alpha$  MAT $\alpha$  [MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 200 trp1-910 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)8-lacZ GAL4 gal80 can1 cyh2] transformiert. Vor Beginn des eigentlichen Screenings wurden die pGAD426 und pBTM117c Vektoren mit den verschiedenen TPH2-Konstrukten hinsichtlich ihrer Autoaktivierungsfähigkeit getestet. Alle Autoaktivierer wurden vom Screening ausgeschlossen. Für das Interaktionsmating wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters jeweils 5  $\mu$ l einer Flüssigkultur der MAT $\alpha$  Stämme in 384-Well Mikrotiterplatten (MTPs) replikaplatziert, kultiviert und mit 40  $\mu$ l gepoolter MAT $\alpha$  Stämme (8 Preys/Pool) gemischt. Die Hefemixturen wurden nun unter Nutzung eines Spottingroboters auf YPD Agarplatten transferiert und 36 h bei 30°C kultiviert. Nach dem Mating wurden die Klone automatisiert von den Platten gepickt und in 384-Well-MTPs mit SDII (-Leu-Trp) Flüssigmedium umgesetzt, um zunächst die diploiden, beide Fusionsproteine exprimierenden Hefen zu selektionieren. Zur Selektion der positiven Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) wurden die diploiden Hefen vom SDII Medium auf SDIV (-Leu-Trp-Ura-His) Selektionsagarplatten und simultan auf Nylonmembranen auf SDIV Agarplatten gespottet. Nach 5-6 Tagen Inkubation bei 30°C wurden digitalisierte Bilder der Agarplatten und Nylonmembranen unter Nutzung der Software Visual Grid (GPC Biotech, München) hinsichtlich Koloniewachstums und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität untersucht. Zur Bestätigung der in diesem Test detektierten Interaktionen wurden die 8 Preys aus jedem positiven Pool einzeln in 96-Well-MTPs eingesät und nochmals mit den hTPH2-Baits verpaart. Nach 36 h bei 30°C wurden die Hefekolonien zur Selektion der diploiden, beide Fusionsproteine exprimierenden Zellen auf SDII Agarplatten gespottet. Nach 4 Tagen bei 30°C wurden die Kolonien zum endgültigen Test auf SDIV Platten und SDIV Nylonmembranen übertragen.

## 2.2.8 Tierversuche

### 2.2.8.1 Tierstämme und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden DBA/2 und C57BL/6 Linien der Spezies *Mus musculus* verwendet, welche in Gruppen von bis zu acht Tieren in klimatisierten Räumen mit einem 12 h-12 h-Hell-Dunkel-Zyklus und freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten wurden.

### 2.2.8.2 Rückkreuzung

Die den C1473G Polymorphismus tragenden DBA/2 Mäuse wurden vor Beginn der Experimente über acht Generationen auf C57BL/6 Background zurückgekreuzt. Die dazugehörigen C57BL/6 Mäuse stammten entweder aus eigener Zucht oder wurden, wie auch die DBA/2 Mäuse, von Charles River (Berlin) bezogen. Die Tiere wurden in jeder Generation genotypisiert und die Tiere, welche beide TPH-Allele trugen (C/G) wurden mit C57BL/6 Wildtypmäusen (C/C) weiterverpaart. Die positiven heterozygoten Tiere der F8 wurden untereinander verpaart, um homozygote C/C und G/G Tiere für die anschließenden Versuche zu erhalten.

Für die Versuche wurden Tiere im Alter von 12-16 Wochen, für die Verpaarungen Tiere 8-14 Wochen alte Tiere verwendet.

### 2.2.8.3 Verhaltenstests

#### 2.2.8.3.1 Forced Swimming Test (FST)

Der FST, ein Verhaltenstest zur Bestimmung depressionsartigen Verhaltens und zur Einschätzung der Wirksamkeit antidepressiver Substanzen, wurde nach den Beschreibungen von Porsolt et al. (Porsolt et al., 77; Porsolt et al., 78) durchgeführt. Die Mäuse wurden einzeln für 6 min in ein Bechergals (27 cm tief, 16.5 cm Durchmesser) gesetzt, das bis zu einer Höhe von 13 cm mit 24°C warmem Wasser gefüllt war. Innerhalb dieses Zeitraumes wurde das Verhalten der Tiere mit Hilfe einer Videokamera aufgezeichnet. Anhand der Aufzeichnungen wurde dann die Gesamtimmobilitätszeit bestimmt. Als Immobilität wurde hierbei ein Zustand definiert, in dem die Mäuse nicht mehr hektisch zu entkommen versuchten, sondern sich nur noch durch minimale Bewegungen über Wasser hielten. Nach jedem Versuchstier wurde das Wasser im Zylinder erneuert.

#### 2.2.8.3.2 Elevated Plus Maze Test (PM)

Angstähnliches Verhalten wurde mit Hilfe des PM Test nach der Methode von Pellow *et al.* (Pellow et al., 85) gemessen. Das Plus Maze bestand aus grauem Plexiglas. Es hatte zwei offene Arme (30 x 5 cm) und zwei geschlossene Arme (30 x 5 x 10 cm). Die Arme gingen von einer zentralen Plattform (5 x 5 cm) mit einer Höhe von 45 cm aus. Eine 0.3 cm hohe Brüstung um die offenen Arme herum sollte das Herunterfallen der Tiere verhindern. Die Maus wurde am Startpunkt eines offenen Armes mit der Schnauze zum Zentrum in das PM eingesetzt. Das Verhalten wurde 10 min lang mit einer sich über dem PM befindenden Kamera aufgezeichnet. Es wurde die in den offenen und geschlossenen Armen verbrachte Zeit und die Anzahl der Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme ermittelt. Die Aktivität in den offenen Armen wurde in Form von zwei Parametern angegeben: (1) Zeit, die in den offenen Armen verbracht wurde und (2) Anzahl der Eintritte in die offenen Arme in Prozent der Gesamteintritte in offene und geschlossene Arme. Falls beide Parameter sich im Vergleich zur Kontrolle in die gleiche Richtung veränderten und einer der Parameter signifikant verändert war, wurde angenommen, dass ein Effekt auf das Angstverhalten vorhanden war. Tiere, die vom PM fielen, wurden vom Experiment ausgeschlossen.

#### 2.2.8.4 *Tötung und Organentnahme*

Die Tiere wurden im durch cervikale Dislokation getötet. Die entnommenen Organe wurden sofort gewogen und anschließend bei -80°C eingefroren.

#### 2.2.8.5 *Isolierung von Thrombozyten aus dem Blut*

Den Probanden wurden 10 ml Heparin-Blut abgenommen und zentrifugiert (120 g, 20 min). Die obere, thrombozytenreiche Plasmaphase (PRP) wurde in ein neues Gefäß überführt und gut durchmischt. 100 µl der PRP wurden mit 100 µl PFA gemischt und bei 4°C gelagert um später die Thrombozytenanzahl/µl zu bestimmen. Weitere 300 µl des PRP wurden zwecks Zellaufschluss und Proteinausfällung mit 12 µl PCA versetzt, gevortext, 2 x 30 sec mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert (13.000 g, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde 1:10 verdünnt und mit der HPLC Anlage vermessen.

#### 2.2.9 Quantifizierung

Die Quantifizierung von Bandenstärken von Westernblotts und RPAs erfolgte mit dem Programm TINA2.0.

### 2.2.10 Statistik

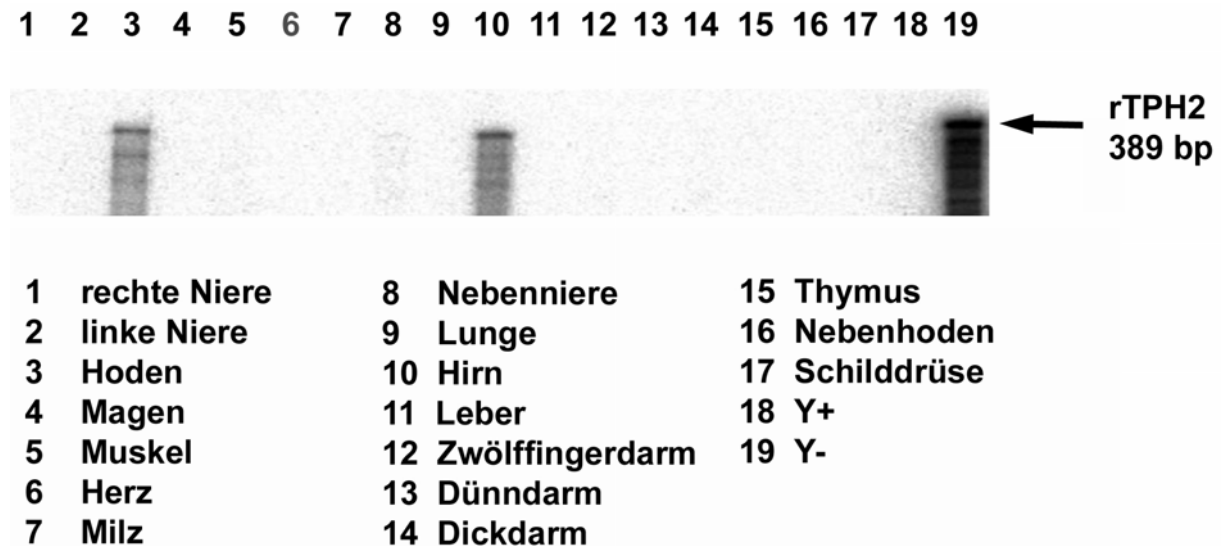
Die erhaltenen Datenreihen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism4 statistisch ausgewertet. Alle in den Diagrammen oder Tabellen dargestellten Werte sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Datenreihen. Das Signifikanzniveau zwischen Datenreihen wurde mit Hilfe des Student t-Tests (zweiseitig, Typ 3) ermittelt. Unterschiede mit Irrtumswahrscheinlichkeiten  $p \leq 0.05$  wurden als signifikant erachtet.

### 3 Ergebnisse

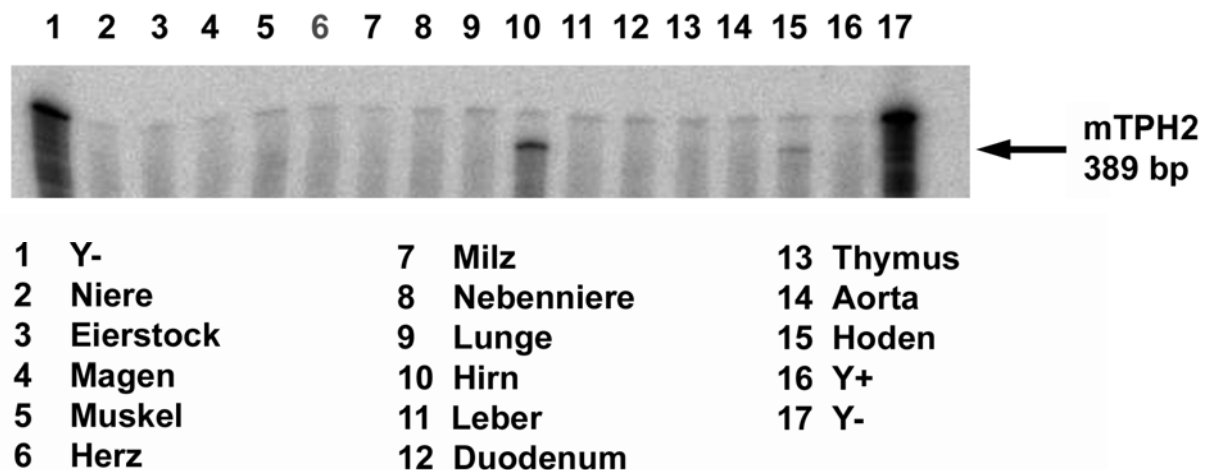
#### 3.1 Expression der TPH

##### 3.1.1 Expressionsmuster der TPH-Isozyme in Ratte und Maus

Bei der Untersuchung verschiedener Organe von Ratten und Mäusen konnte in beiden Spezies eine starke TPH2-Expression in Hirn und Testis nachgewiesen werden (Abb. 15 und 16).



**Abb. 15: rTPH2-Expression in Rattenorganen.** In einem RPA wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Rattengewebe mit 20.000 cpm der rTPH2-Sonde hybridisiert. Die Y<sup>+</sup>- und Y<sup>-</sup>-Spur enthielten 20 µg verdauter bzw. unverdauter Hefe-tRNA.



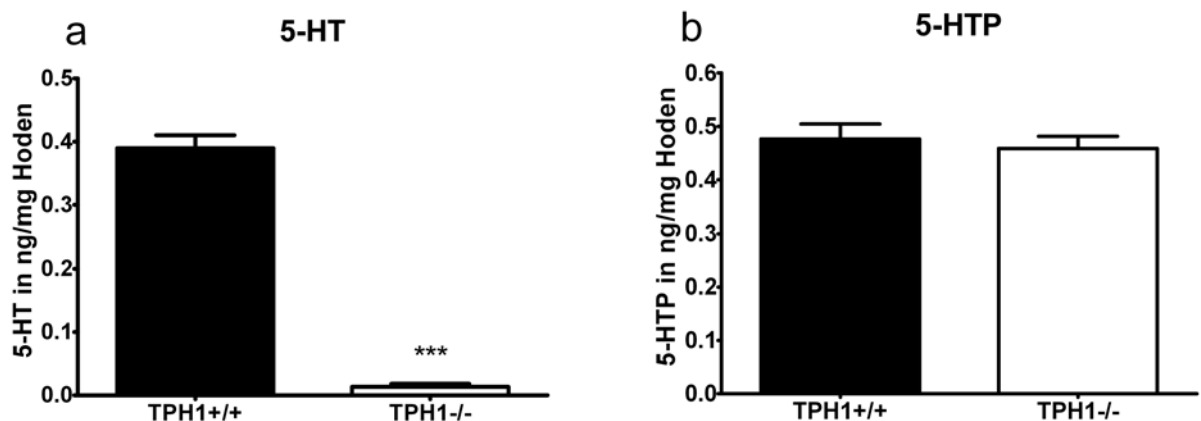
**Abb. 16: mTPH2-Expression in Mausorganen.** In einem RPA wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Mausgewebe mit 20.000 cpm der mTPH2-Sonde hybridisiert. Die Y<sup>+</sup>- und Y<sup>-</sup>-Spur enthielten 20 µg verdauter bzw. unverdauter Hefe-tRNA.



### 3.1.2 TPH im Hoden

#### 3.1.2.1 5-HT und 5-HTP im Hoden von TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen

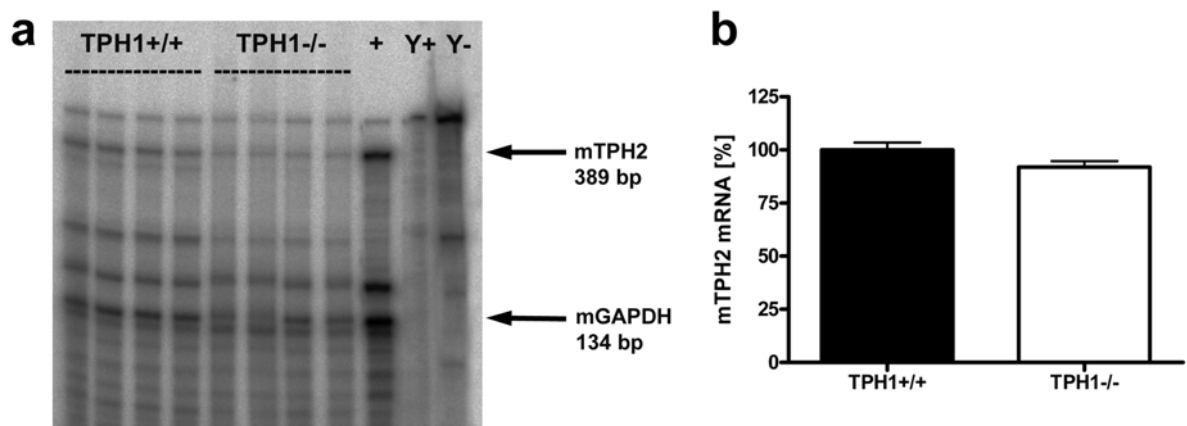
Aufgrund der Detektion von TPH2-mRNA im Hoden von Mäusen und Ratten sollte dieses Gewebe unter Zuhilfenahme von TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen genauer untersucht werden. Bei der Messung der 5-HT-Level stellte sich heraus, dass im Hoden von TPH1-/- Mäuse gemäß der Vermutungen so gut wie kein 5-HT mehr vorhanden war. Die TPH1+/+ Tiere hingegen hatten hohe 5-HT-Werte von ~ 0.4 ng/mg Gewebe (Abb. 17a). Bei der Betrachtung des 5-HTP ergab sich ein komplett anderes Bild. Sowohl die TPH1-/- als auch die TPH1+/+ Tiere hatten gleich hohe 5-HTP-Level im Hoden (Abb. 17b). Dies ließ vermuten, dass das im Hoden der TPH1+/+ Tiere detektierte 5-HT lediglich vom Blut und der Tiere stammte und auf die Aktivität der TPH1 zurückging, wohingegen das im Hoden nachgewiesene 5-HTP ausschließlich durch die Aktivität der lokalen TPH2 gebildet wurde.



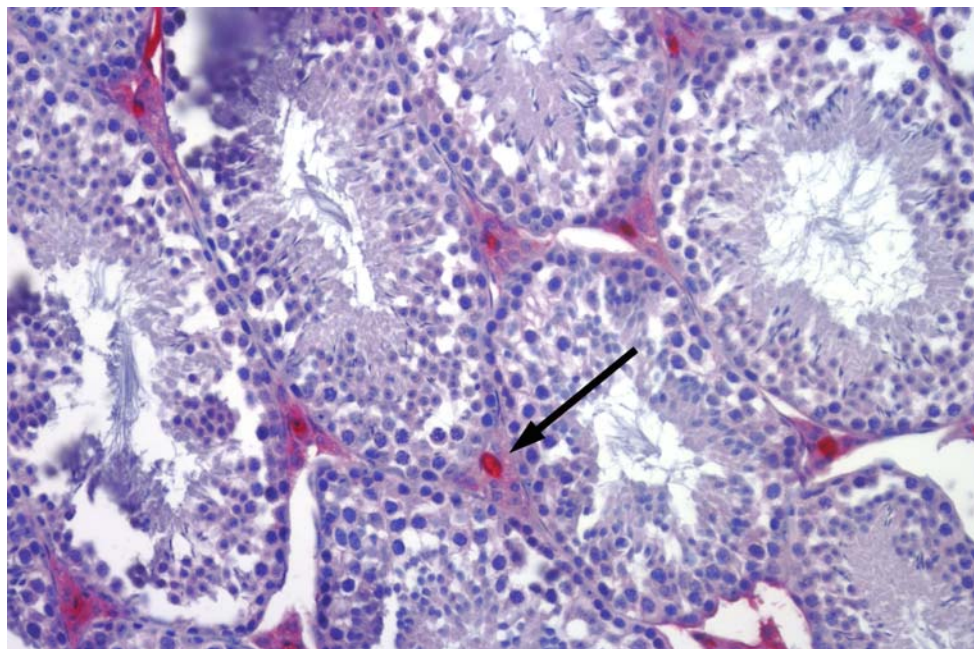
**Abb. 17: 5-HT (a) und 5-HTP (b) im Hoden von TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen.** Der 5-HT- (a) und 5-HTP-Gehalt (b) von Mäusehoden wurde mittels HPLC-Messung in Gesamthodenlysaten bestimmt und auf das Hodengewicht normiert. n = 12; \*\*\*: p > 0,001.

#### 3.1.2.2 TPH2 im Hoden von TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen

Sowohl im Hoden von TPH1+/+ als auch im Hoden der TPH1-/- Mäuse konnten die gleichen Mengen von mTPH2-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 18). mTPH1-mRNA war im RPA nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt). Die immunhistochemische Untersuchung der Gewebe bestätigte das Vorhandensein von 5-HTP im Hoden der Mäuse. Es war in den Leydigzellen lokalisiert (Abb. 19).



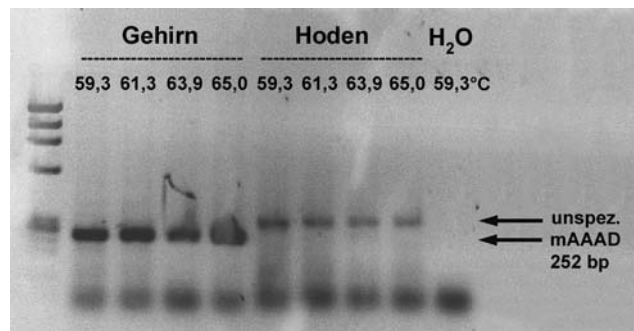
**Abb. 18: mTPH2-Expression im Hoden von TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen.** (a) In einem RPA wurden jeweils 40 µg Gesamt-RNA vom Hoden und 15 µg Gesamt-RNA von Hirnstamm mit 40.000 cpm der mTPH2-Sonde hybridisiert. Als Quantifizierungsgrundlage diente das Signal einer mGAPDH-Sonde (7500 cpm/Probe). Die Y<sup>+</sup>- und Y<sup>-</sup>-Spur enthielten 40 µg verdauter bzw. unverdauter Hefe-tRNA, die + Spur enthält eine mTPH2-Positivkontrolle aus dem Hirnstamm. (b) Quantifizierung des RPA.



**Abb. 19: 5-HTP im Mäusehoden.** Paraffinschnitte der Mäusehoden wurden mit 5-HTP-Antikörper inkubiert.

### 3.1.2.3 AAAD im Hoden von TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen

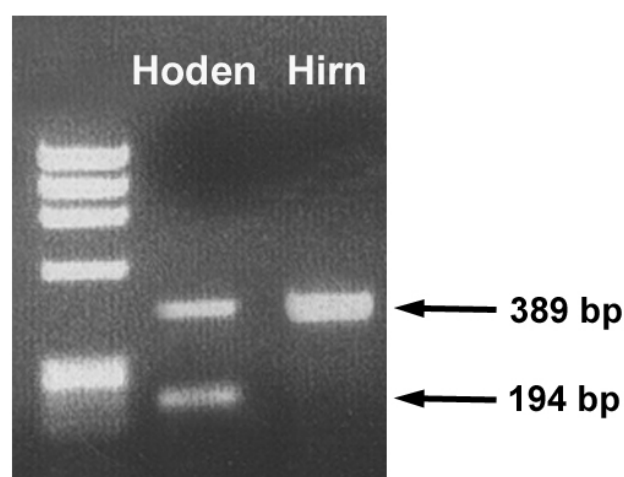
Die völlige Abwesenheit von 5-HT im Hoden von TPH1-/- Tieren und die gleichzeitige Anwesenheit großer Mengen 5-HTP in den TPH1+/+ und -/- Tieren ließ vermuten, dass der Hoden über keine, bzw. nur eine sehr geringe AAAD Aktivität verfügt und somit in diesem Organ keine gewebeeigene 5-HT-Synthese stattfindet. Diese Vermutung wurde dadurch bestätigt, dass weder mit Hilfe der RT-PCR (Abb. 20) noch des RPA mAAAD mRNA im Hoden von TPH1+/+ oder -/- Tieren nachgewiesen werden konnte. Das in der Hoden-RT-PCR auftauchende Fragment wurde durch eine Sequenzierung als unspezifische Bande identifiziert.



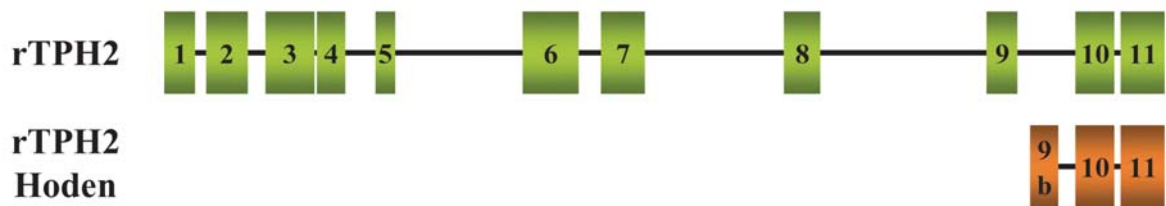
**Abb. 20: mAAAD-Expression im Hoden von TPH1<sup>+/+</sup> und TPH1<sup>-/-</sup> Mäusen.** Bei einer RT-Gradienten-PCR wurde die cDNA von Mäusehirn- und Mäusehoden-Gesamt-RNA zusammen mit dem Primerpaar mAAADfor/mAAADrev eingesetzt. Die angegebenen Temperaturen bezeichnen die bei der Gradienten-PCR verwendeten Annealingtemperaturen.

#### 3.1.2.4 Funktionslose TPH2-Splicevariante im Rattenhoden

Bei der Überprüfung verschiedener Rattenorgane hinsichtlich der Expression von rTPH2-mRNA mittels RT-PCR tauchte im Rattenhoden neben der erwarteten Bande von 389 bp ein zweites, 194 bp großes PCR-Fragment auf (Abb. 21). Durch die Untersuchung dieser Bande mittels 3'- und 5'-RACE-PCR und anschließender Sequenzierung der RACE-Produkte konnte eine Splicevariante der TPH2 im Rattenhoden nachgewiesen werden, die mit einem alternativen Exon 9b beginnt und dann mit den herkömmlichen Exons 10 und 11 endet (Abb. 22). Innerhalb der Sequenz von Exon 9b befinden sich hinter dem initialen ATG Codon allerdings in allen 3 Leserahmen Stopcodons. Aufgrund dieser Tatsache, ihrer geringen Länge und des Fehlens der Sequenzen der katalytischen Domäne in dieser Splicevariante ist die detektierte rTPH2-Variante im Rattenhoden höchstwahrscheinlich als funktionsloses Artefakt anzusehen.



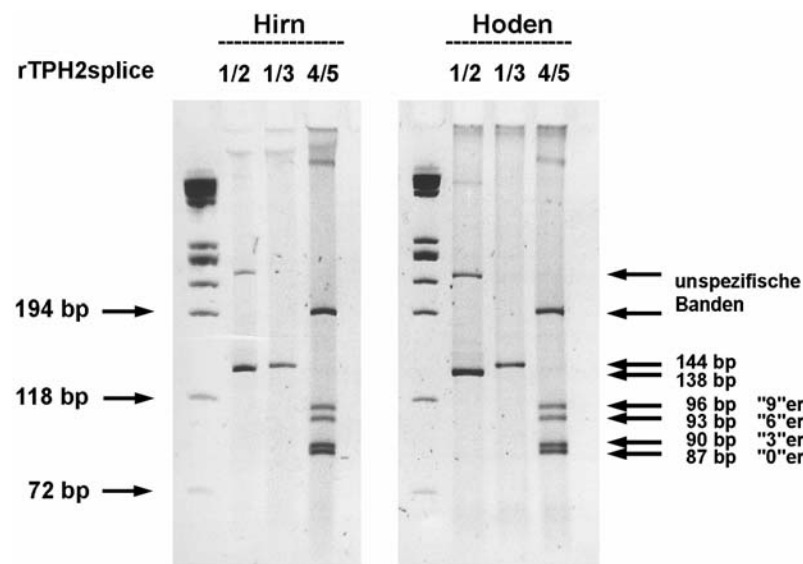
**Abb. 21: mTPH2-Expression im Rattenhoden.** Bei einer RT-PCR wurde die cDNA von Rattenhoden- und Rattenhirn-Gesamt-RNA mit dem Primerpaar m,rTPH2for/TPH2rev eingesetzt. Neben der erwarteten Bande von 389 bp tauchte im Hoden eine zweite, 194 bp große Bande auf.



**Abb. 22: Schematische Darstellung der Splicevariante der TPH2 im Rattenhoden.** Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten wurden aus der Sequenzierung der von den Primern TPH2rev und r,mTPH2for ausgehenden 5' und 3'-RACE-Produkte von Rattenhoden-cDNA gewonnen (grün: Exons der regulären rTPH2; orange: Exons der alternativ gesplitten rTPH2 im Rattenhoden).

### 3.1.3 Alternatives Splicing der TPH2 in Rattenhirn und -hoden

Bei der Betrachtung der Exon-Intron Grenzen der *Tph2*-Gene von Maus, Ratte und Mensch fiel im Bereich der Exons 3 und 4 bei allen 3 Spezies die Nutzung der unüblichen Splicingstelle GC-AG für das von den beiden Exons flankierte Intron 3 auf. 4 Basenpaare von der hier genutzten, unüblichen Splicing-Donor-Stelle GC entfernt liegt im Intron 3 ein GT, welches eine weitaus gebräuchlichere Splicestelle darstellt. Aufgrund dieser Beobachtungen sollte die TPH2-mRNA von Rattenhirn TPH2 im Grenzbereich von Exon 3/4 genauer auf das eventuelle Vorhandensein von alternativen Splicevarianten untersucht werden. Dazu wurden 3 verschiedene PCRs mit Rattenhirn und Rattenhoden cDNA durchgeführt. Das erste Primerpaar rTPHsplice1/ rTPH2splice2 sollte lediglich jene mRNA Variante nachweisen können, welche die ungewöhnliche Splicestelle GC-AG nutzt. Das zweite Primerpaar rTPHsplice1/ rTPH2splice3 war für die 6 Basenpaare längere, die Splicestelle GT-AG verwendende mRNA spezifisch. Zusätzlich wurde noch ein drittes Paar auf den Exons 3 und Exon 4 hybridisierender Primer (rTPH2splice4/rTPH2splice5) eingesetzt. Die beiden ersten Primerpaare lieferten in den PCRs die jeweils erwarteten Bande von 138 und 144 bp (Abb. 23). Somit konnte neben der die GC-AG Stelle nutzenden mRNA die Existenz einer zweiten, die Stelle GT-AG nutzenden und 6 bp längeren Splicevariante nachgewiesen werden. Bei den rTPH2splice4/rTPH2splice5 PCRs ergaben sich neben der erwarteten 87 bp langen GC-AG Bande 3 weitere, größere Fragmente (Abb. 23). Es konnten keine Unterschiede bei der Splicestellennutzung zwischen Hoden und Hirn festgestellt werden.



**Abb. 23: RT-PCR von Rattenhirn und Rattenhoden zum Nachweis verschiedener Splicevarianten der rTPH2.** Die cDNA des jeweiligen Organ-Gesamt-RNA wurde bei 3 PCRs mit den angegebenen Primern eingesetzt. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe eines hochauflösenden 10%igen Polyacrylamidgels aufgetrennt.

Die Sequenzierung dieser 4 PCR Produkte des Primerpaares rTPH2splice4/rTPH2splice5 lieferte 4 Ergebnisse. Diese unterschieden sich durch den Einschub von 0, 3, 6 oder 9 Basenpaaren zwischen der ursprünglichen Nukleotidposition 424 und 425 voneinander, wodurch neben der erwarteten 87 bp Bande ein 90, 93 und 96 bp Fragment auftauchten. Diese Einschübe resultieren wiederum in einer Veränderung der Aminosäuresequenz mit einem Einschub von Isoleucin (I), Glycin (G) und Lysin (K) (Abb. 24).

#### kein Einschub "0er"

ACGGAGGAAGAAG<sub>424</sub> | **gc**aagggtggttctttttttctctttattgggtgattttggaatatgacagatgttcc  
aaaggggagtttaattattatcaaacctgccctgttttcagc**ag** | <sub>425</sub>AACTAGAGGATGTGCCGTGGTTC

gespligte Variante: ACG GAG GAA GAA G|AA CTA GAG GAT GTG CCG TGG TTC

Inserts in der Aminosäuresequenz: T E E E E L E

#### 3 bp Einschub "3er"

ACGGAGGAAGAAG<sub>424</sub> | **gc**aagggtggttctttttttctctttattgggtgattttggaatatgacagatgttcc  
aaaggggagtttaattattatcaaacctgccctgttttcag**ag** | <sub>425</sub>CAG | <sub>428</sub>AACTAGAGGATGTGCCGTGGTTC

gespligte Variante: ACG GAG GAA GAA G | **CA** GAA CTA GAG GAT GTG CCG TGG TTC

Inserts in der Aminosäuresequenz: T E E **I** E E L E



## 6 bp Einschub “6er”

ACGGAGGAAGAAG<sub>424</sub> | GCAAGG<sub>430</sub> | **gt**gggtctctttttttctctttattgggtgattttggaatatgacagatgt  
tccaaaggggaggttaatatattatcaaacctgccctgttttcag**ag** | <sub>431</sub>AACTAGAGGATGTGCCGTGGTTC

gespligte Variante: ACG GAG GAA GAA G**GC AAG G** | AA CTA GAG GAT GTG CCG TGG TTC

Inserts in der Aminosäuresequenz: T E E **G K** E E L E

## 9 bp Einschub “9er”

ACGGAGGAAGAAG<sub>424</sub> | GCAAGG<sub>430</sub> | **gt**gggtctctttttttctctttattgggtgattttggaatatgacagatgt  
tccaaaggggaggttaatatattatcaaacctgccctgttttc**ag** | <sub>431</sub>CAG | <sub>434</sub>AACTAGAGGATGTGCCGTGGTTC

gespligte Variante: ACG GAG GAA GAA G**GC AAG G** | **CA** GAA CTA GAG GAT GTG CCG TGG TTC

Inserts in der Aminosäuresequenz: T E E **G K I** E E L E

**Abb. 24: Sequenzen der Splicevarianten der TPH2 im Rattenhirn.** Die Sequenzen der abgebildeten Splicevarianten wurden durch die Sequenzierung der 4 PCR Produkte der mit den auf den Exons 3 und 4 der rTPH2 hybridisierenden Primern rTPH2splice4 und rTPH2splice5 erhaltenen Fragmente gewonnen (grau: Exonsequenz; Kleinbuchstaben: Intronsequenz; rot: Einschub; tiefgestellte Zahlen: Nukleotidposition innerhalb der kodierenden cDNA).

Ein Vergleich der Intron 3 Sequenzen von Ratte, Maus und Mensch deutet darauf hin, dass das bei Ratte beobachtete alternative Splicing mit einem 6er Einschub auch beim Menschen unter Nutzung der GT-AG Variante theoretisch möglich wäre. Es fehlt aber die bei der Ratte vorhandene alternative Spliceakzeptor-Stelle AG auf der dem Exon 4 zugewandten Seite des Introns 3, womit ein 3er und 9er Einschub beim Menschen nicht möglich ist. Bei der Maus ist keine der alternativen Splicedonor- oder Akzeptor-Stellen vorhanden (Abb. 25).

rTPH2	GAAAAACACGTCAACATGCTCCATATTGAATCCAGGAGGTCCCGGCCAAGAAGTTCTGAA
mTPH2	GAAAAACATGTCAACATGCTTCATATCGAATCCAGGAGGTCCCGACGAAGAAGTTCTGAA
hTPH2	GAAAAACGTGTCAACATGGTTCATATTGAATCCAGGAAATCTCGGCCAAGAAGTTCTGAG
	***** * ***** ** *
rTPH2	GTCGAAATCTTCGTGGACTGTGAATGTGGCAAAACAGAATTCAACGAGCTCATTCAAGTTG
mTPH2	GTCGAAATCTTCGTGGACTGCGAATGTGGCAAAACGGAATTCAATGAGCTCATCCAGTTG
hTPH2	GTTGAAATCTTTGTGGACTGTGAGTGTGGGAAAACAGAATTCAATGAGCTCATTCAAGTTG
	** ***** * ***** ***** ***** ***** *****
rTPH2	CTCAAGTTTCAGACCACCATTTGTGACGCTGAATCCACCTGACAACATTTGGACGGAGGAA
mTPH2	CTGAAATTTTCAGACCACCATTTGTGACCCTGAATCCGCCTGAGAGCATTGGACGGAGGAA
hTPH2	CTGAAATTTCAAACCACTATTGTGACGCTGAATCCTCCAGAGAACATTTGGACAGAGGAA
	** * ***** ***** ***** ***** * * * ***** *****
rTPH2	GAAG <b>g</b> aagg <b>g</b> gggtctctttttttctctttattgggtgattttggaatatgacagatgt
mTPH2	GAAG <b>g</b> aaggctgatttcttttttt-tctctagtggctgactttggaatatgacagatag
hTPH2	GAAG <b>g</b> aagg <b>g</b> gggtcttagcttgt-----cgggtaactttgcaatctgacaaatat
	***** *

```

rTPH2      tccaaaggggag-----ttaatatattatcaaacctgccctgttttcagcag
mTPH2      cccaaagggcgag-----ttaacattatcaaacctgcactgttacctgcag
hTPH2      tgcaaaggggaaacacaaatctgtgaactaatatttttgaacctgcactgttttcaacag
          ***** **                               *** ** * ***** ** * ***

rTPH2      AACTAGAGGATGTGCCGTGGTTCCCTCGGAAGATCTCTGAGTTAGACAGATGCTCTCACA
mTPH2      ATCTCGAGGATGTGCCGTGGTTCCCTCGGAAGATCTCTGAGTTAGACAGATGCTCTCACC
hTPH2      AGCTAGAGGATGTGCCCTGGTTCCCTCGGAAGATCTCTGAGTTAGACAAATGCTCTCACA
          * * * ***** ** * ***** ** * ***** ** * ***** ** *

rTPH2      GAGTCCTCATGTACGGCACCGAGCTTGACGCCGACCACCCA
mTPH2      GAGTCCTCATGTACGGCACCGAGCTTGATGCCGACCATCCA
hTPH2      GAGTTCTCATGTATGGTTCTGAGCTTGATGCTGACCACCCA
          **** ***** ** * ***** ** * ***** ** *

```

Abb. 25: Alignment des DNA-Bereiches des Introns 3 von humaner, Mäuse- und Ratten-TPH2 (rot: reguläre Splicedonor- und Spliceakzeptorstellen; grün: alternative Splicedonor- und Spliceakzeptorstellen).

## 3.2 Biochemische Charakterisierung der TPH

### 3.2.1 Herstellung der TPH-Konstrukte

Für die biochemische Charakterisierung der hTPHs wurde eine Vielzahl von Konstrukten erstellt (Abb. 26). Die cDNA der humanen Zelllinie TT diente hierbei als Template für die erforderlichen PCRs. Die jeweiligen Konstrukte wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1+ kloniert und anschließend transient in COS7 Zellen exprimiert.




















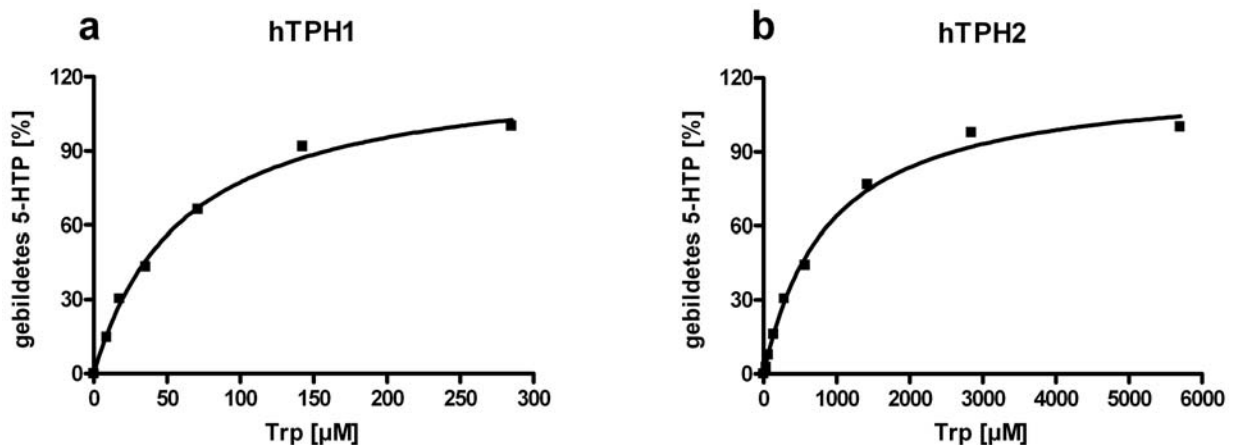
	Konstrukt	Länge	forward Primer	reverse Primer
	TPH2 full-length	1-490	h2Xholfor	h2CTApalrev
	TPH1 full-length	1-444	h1Nhelfor	hTPH1Kpnrev
	TPH1-2	1-44/1-444	h2Nhelfor h1HindIIIfor	h2HindIIIrev hTPH1Kpnrev
	TPH2 ΔC17	1-473	h2Xholfor	h2ΔC17Apalrev
	TPH2 ΔC19	1-471	h2Xholfor	h2ΔC19Apalrev
	TPH2 ΔC51	1-439	h2Nhelfor	h2ΔC51Kpnrev
	TPH2 ΔN44	45-490	h2dN44Xholfor	2CTApalrev
	TPH2 N-terminus 44	1-44	synthetisches	Peptid
	TPH1FLAG full-length	1-444	h1FLAGXholfor	h1CTApalrev
	TPH1myc full-length	1-444	h1mycXholfor	h1CTApalrev
	TPH2FLAG full-length	1-490	h2FLAGXholfor	h2CTApalrev
	TPH2myc full-length	1-490	h2mycXholfor	h2CTApalrev
	TPH2 ΔC17FLAG	1-473	h2FLAGXholfor	h2ΔC17Apalrev
	TPH2 ΔC17myc	1-473	h2mycXholfor	h2ΔC17Apalrev
	TPH2 ΔC19FLAG	1-471	h2FLAGXholfor	h2ΔC19Apalrev
	TPH2 ΔC19myc	1-471	h2mycXholfor	h2ΔC19Apalrev
	TPH2 ΔC51FLAG	1-439	h2FLAGXholfor	h2ΔC51Apalrev
	TPH2 ΔC51myc	1-439	h2mycXholfor	h2ΔC51Apalrev
	TPH2 C-terminales Peptid	462-482	synthetisches	Peptid

Abb. 26: TPH-Inserts der pcDNA3.1 Expressionvektoren und synthetische TPH2-Peptide.

### 3.2.2 Kinetiken und $K_m$ -Werte der TPH Enzyme und ihrer Mutanten

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der rekombinanten hTPH1 und hTPH2, der Kombinationsmutante hTPH1-2, welche sich aus der full-length Sequenz der hTPH1 und dem 44 Aminosäuren langen N-Terminus der hTPH2 zusammensetzte, und der verschiedenen Deletionsmutanten (hTPH2 $\Delta$ N44, hTPH2 $\Delta$ C17, hTPH2 $\Delta$ C19 und hTPH2 $\Delta$ C17) wurde ein *in vitro* TPH-Aktivitätsassay mit den Gesamtllysaten von transfizierten COS7 Zellen durchgeführt. Zwei Beispiele für die sich daraus ergebenden Michaelis-Menten-Kinetiken von hTPH1 und hTPH2 sind in Abb. 27 dargestellt.



**Abb. 27: Michaelis-Menten-Kinetik von hTPH1 und hTPH2.** Das Gesamtlisat von mit hTPH1 (a) und hTPH2 (b) transfizierten COS7 Zellen wurde im TPH-Aktivitätsassay zusammen mit dem synthetischen Kofaktor 6MPH4 (250 µM) und verschiedenen Trp-Konzentrationen von 0 bis 6000 µM für 30 min bei 37°C inkubiert. Das gebildete 5-HTP wurde mittels HPLC Messung quantifiziert und in % der höchsten 5-HTP-Menge angegeben. Die Michealis-Menten-Kinetiken wurden mit dem Programm GraphPadPrism erstellt. n = 3

Die Fusion der N-terminalen 44 Aminosäuren der TPH2 mit der full-length TPH1 führte zu keiner signifikanten Veränderung des  $V_{max}$ -Wertes (Tab. 30) und bewirkte auch nur bei der Nutzung des synthetischen Kofaktors 6MPH4 eine leichte Erhöhung des  $K_m$ -Wertes (Tab. 30).

**Tab. 30:  $V_{max}$ -Werte der TPH1-Konstrukte.**

Konstrukt	$V_{max} \pm SD$ [% of TPH1] BH4	$V_{max} \pm SD$ [% of TPH1] 6MPH4
TPH1	100.0 $\pm$ 4.9	100.0 $\pm$ 0.7
TPH1-2	83.6 $\pm$ 5.8	112.6 $\pm$ 5.7

Das Gesamtlisat von mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten COS7 Zellen wurde in zwei Fraktionen geteilt. Eine davon wurde für einen Westernblott verwendet, die andere wurde im TPH-Aktivitätsassay zusammen mit dem natürlichen Kofaktor BH4 (300 µM) bzw. dem synthetischen Kofaktor 6MPH4 (250 µM) und verschiedenen Trp-Konzentrationen von 0 bis 6000 µM für 30 min bei 37°C inkubiert. Das gebildete 5-HTP wurde mittels HPLC Messung quantifiziert. Die  $V_{max}$ -Werte wurden mittels Michealis-Menten-Kinetik-Funktion des Programms GraphPadPrism berechnet und über eine Westernblottquantifizierung der TPH1-Proteinmenge auf % der  $V_{max}$  der full-length TPH1 normiert. n = 3.



Auf die  $V_{\max}$ -Werte der Deletionsmutanten (Tab. 31) soll in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden.

**Tab. 31:  $V_{\max}$ -Werte der TPH2-Konstrukte.**

Konstrukt	$V_{\max} \pm \text{SD}$ [% of TPH2] BH4	$V_{\max} \pm \text{SD}$ [% of TPH2] 6MPH4
TPH2	100.0 $\pm$ 25.8	100.0 $\pm$ 27.2
TPH2 $\Delta$ N44	387.1 $\pm$ 65.2 ***	298.6 $\pm$ 78.3 ***
TPH2 $\Delta$ C17	56.2 $\pm$ 21.5 **	51.5 $\pm$ 17.6 ***
TPH2 $\Delta$ C19	44.2 $\pm$ 17.7 **	47.0 $\pm$ 12.7 ***
TPH2 $\Delta$ C51	1.3 $\pm$ 0.5 ***	0.8 $\pm$ 0.3 ***

Das Gesamtlysate von mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten COS7 Zellen wurde in zwei Fraktionen geteilt. Eine davon wurde für einen Westernblott verwendet, die andere wurde im TPH-Aktivitätsassay zusammen mit dem natürlichen Kofaktor BH4 (300  $\mu$ M) bzw. dem synthetischen Kofaktor 6MPH4 (250  $\mu$ M) und verschiedenen Trp-Konzentrationen von 0 bis 6000  $\mu$ M für 30 min bei 37°C inkubiert. Das gebildete 5-HTP wurde mittels HPLC Messung quantifiziert. Die  $V_{\max}$ -Werte wurden mittels Michealis-Menten-Kinetik-Funktion des Programms GraphPadPrism berechnet und über eine Westernblottquantifizierung der TPH2-Proteinmenge auf % der  $V_{\max}$  der full-length TPH2 normiert. n = 3; \*\*: p > 0,01 gegenüber full-length TPH2; \*\*\*: p > 0,001 gegenüber full-length TPH2.

Der  $K_m$ -Wert der hTPH2 war 5-mal (BH4) bzw. 16-mal höher als derjenige der hTPH1. Die  $K_m$ -Werte der Deletionsmutanten sollen in den folgenden Kapiteln besprochen werden (Tab. 32).

**Tab. 32:  $K_m$ -Werte aller Konstrukte.**

Konstrukt	$K_m \pm \text{SD}$ [ $\mu$ M Trp] BH4	$K_m \pm \text{SD}$ [ $\mu$ M Trp] 6MPH4
TPH1	15 $\pm$ 5 **	53 $\pm$ 12 ***
TPH2	77 $\pm$ 25 <sup>##</sup>	802 $\pm$ 71 <sup>###</sup>
TPH1-2	21 $\pm$ 6 ***	80 $\pm$ 9 *** <sup>#</sup>
TPH2 $\Delta$ N44	71 $\pm$ 5 <sup>##</sup>	431 $\pm$ 134 * <sup>##</sup>
TPH2 $\Delta$ C17	23 $\pm$ 7 ***	144 $\pm$ 4 *** <sup>###</sup>
TPH2 $\Delta$ C19	16 $\pm$ 5***	141 $\pm$ 31 *** <sup>##</sup>

Das Gesamtlysate von mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten COS7 Zellen wurde im TPH-Aktivitätsassay zusammen mit dem natürlichen Kofaktor BH4 (300  $\mu$ M) bzw. dem synthetischen Kofaktor 6MPH4 (250  $\mu$ M) und verschiedenen Trp-Konzentrationen von 0 bis 6000  $\mu$ M für 30 min bei 37°C inkubiert. Das gebildete 5-HTP wurde mittels HPLC Messung quantifiziert. Die  $K_m$ -Werte wurden mittels Michealis-Menten-Kinetik-Funktion des Programms GraphPadPrism berechnet. n = 3; \*: p > 0,05 gegenüber TPH2; \*\*: p > 0,01 gegenüber TPH2; \*\*\*: p > 0,001 gegenüber TPH2; <sup>#</sup>: p > 0,05 gegenüber TPH1; <sup>##</sup>: p > 0,01 gegenüber TPH1 <sup>###</sup>: p > 0,001 gegenüber TPH1.

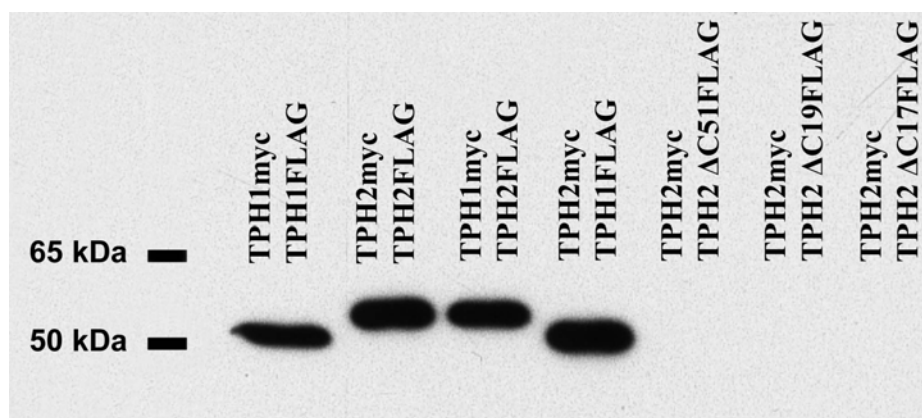
### 3.2.3 Der TPH2-C-Terminus

#### 3.2.3.1 Auswirkung verschiedener C-terminaler Deletionen auf die TPH2-Aktivität

Die Deletion von Aminosäuren vom C-Terminus resultierte in Abhängigkeit von der Deletionslänge in einer mehr oder weniger starken Verminderung des  $V_{\max}$ -Wertes der hTPH2 (Tab. 31). Die  $\Delta 51$  Mutante verlor ihre Aktivität so gut wie vollständig und erreichte nur ein 1 % des  $V_{\max}$  des full-length Enzyms. Die  $V_{\max}$  der Mutanten  $\Delta 19$  und  $\Delta 17$  lag bei lediglich 50 % der full-length Aktivität. Aufgrund der geringen Aktivität der  $\Delta 51$  Mutante konnte ihr  $K_m$ -Wert nicht bestimmt werden. Die  $K_m$ -Werte der  $\Delta 19$  und  $\Delta 17$  Mutante lagen bei  $\sim 30$  und  $\sim 20$  % (BH4) bzw.  $\sim 18$  % (6MPH4) des full-length hTPH2 Wertes (Tab. 32).

#### 3.2.3.2 Auswirkung verschiedener C-terminaler Deletionen auf die TPH2-Oligomerisierung

Aufgrund der beobachtete Reduktion der TPH2-Aktivität durch die Deletion C-terminaler Fragmente, welche bei der TPH1 bekannterweise die Tetramerisierungsdomäne des Enzyms enthalten (Mockus et al., 97), stellte sich die Frage, ob möglicherweise eine Veränderung des Oligomerisierungszustandes der TPH2 für die verminderte Aktivität verantwortlich sein könnte. Unter Nutzung von N-terminal mit zwei unterschiedlichen Epitopen (myc und FLAG) markierten TPH2-Konstrukten konnte im Immunopräzipitationsexperiment gezeigt werden, dass sowohl hTPH1 als auch hTPH2 dazu in der Lage sind, Homooligomere zu bilden. Die beiden Isozyme verfügen außerdem über die Fähigkeit zur Heterooligomerbildung. Die Deletion von 51, 19 und 17 Aminosäuren vom C-Terminus der TPH2 verhinderte eine Interaktion der Deletionsmutanten mit dem full-length Enzym (Abb. 28).

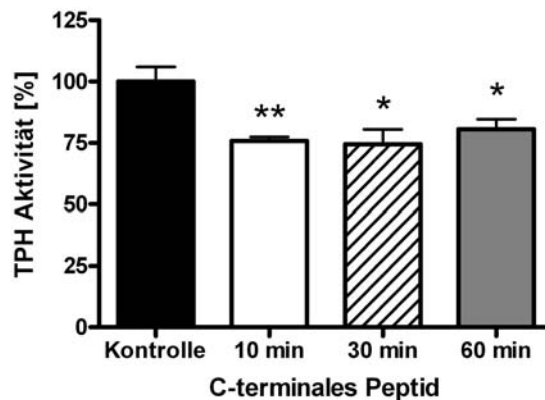


**Abb. 28: Koimmunopräzipitation.** COS7 Zellen wurden mit den angegebenen myc bzw. FLAG markierten TPH2- und TPH1-Konstrukten kotransfiziert. Danach erfolgte eine Immunopräzipitation mit anti-myc gekoppelten Agarosebeads. Die koimmunopräzipitierten FLAG-Konstrukte wurden anschließenden im Westernblott mit anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen.

### 3.2.3.3 Effekte von C-terminalem Peptid auf die TPH2-Aktivität und -oligomerisierung

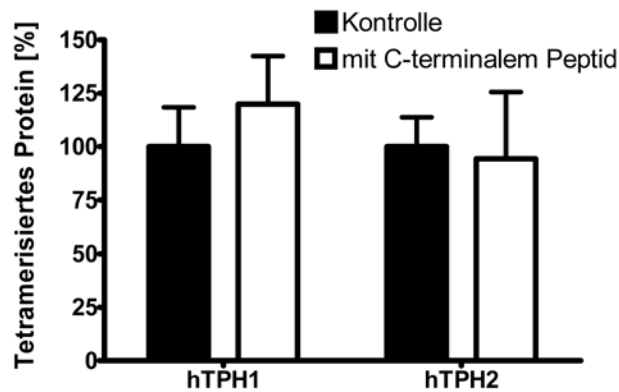
Da die C-terminalen Deletionsmutanten hTPH2 $\Delta$ C17 und hTPH2 $\Delta$ C19 ihre Fähigkeit zur Oligomerisierung und gleichzeitig etwa 50% ihres  $V_{\max}$  verloren hatten, lag die Vermutung nahe, dass Oligomerisierung und Aktivität in engem Zusammenhang miteinander stehen. Deswegen sollte versucht werden, die Oligomerisierung der TPH durch Zugabe eines C-terminalen Peptids zu verhindern, und damit Einfluss auf die Aktivität der TPH zu nehmen. Die Sequenz des C-terminalen Peptids war homolog zu den Aminosäuren S<sub>462</sub> bis N<sub>482</sub> der hTPH2. Damit verfügte das Peptid über die vermutlich für die intermolekulare Wechselwirkung der hTPH2-Monomere entscheidenden Aminosäuren L<sub>470</sub>, L<sub>474</sub>, Val<sub>477</sub> und L<sub>481</sub> und könnte somit möglicherweise durch Bindung an die TPH-C-Termini diese für einen anderen TPH2-Bindungspartner blockieren, somit die Oligomerisierung behindern und die TPH-Aktivität auf dem Niveau der Monomeraktivität halten.

Durch die Zugabe von C-terminalem Peptid im Vorfeld des TPH-Assays konnte die TPH-Aktivität tatsächlich signifikant auf maximal 75 % nach 10 min Vorinkubationszeit gesenkt werden (Abb. 29). Die Stärke des inhibitorischen Effektes nahm allerdings mit der Dauer der Inkubationszeit ab.



**Abb. 29: Auswirkung von C-terminalem Peptid auf die Aktivität von hTPH1 und 2.** Das Lysat der mit TPH1 bzw. TPH2 transfizierten COS7 Zellen wurde zunächst für unterschiedliche Zeiträume rotierend bei 4°C mit dem C-terminalem Peptid (50 nM) inkubiert. Anschließend wurden diese vorbehandelten Lysate im TPH-Aktivitätsassays zusammen mit Trp (400  $\mu$ M) und 6MPH4 (250  $\mu$ M) eingesetzt. Das während des Assays gebildete 5-HTP wurde mittels HPLC Messung quantifiziert. n = 6; \*: p > 0,05.

Um zu untersuchen, ob dem beobachteten inhibitorischen Effekt tatsächlich eine Verminderung der Oligomerisierungsfähigkeit zugrunde lag, wurde während eines Koimmunopräzipitationsexperimentes mit TPHmyc und TPHFLAG das C-terminale Peptid hinzugegeben. Es sollte durch Bindung an die C-Termini der TPH-Monomere diese für die Bindung anderer TPH-Monomere blockieren. Das Peptid hatte aber weder auf die Oligomerisierung der TPH2 noch auf die der TPH1 einen signifikanten Einfluss (Abb. 30).



**Abb. 30: Auswirkung von C-terminalem Peptid auf die Oligomerisierung von hTPH1 und 2.** COS7 Zellen wurden mit myc und FLAG gelabelten hTPH1- bzw. hTPH2-Konstrukten transfiziert. Anschließend wurden die Lysate von TPH1myc und TPH1FLAG bzw. TPH2myc und TPH2FLAG miteinander gemischt, teilweise mit C-terminalem TPH2-Peptid (50 nM) versetzt und mit anti-myc gekoppelten Agarosebeads für 4 h bei 4°C immunopräzipitiert. Im anschließenden Westernblott wurde die Menge des kopräzipitierten TPHFLAG Proteins quantifiziert und auf die Menge der präzipitierten TPHmyc Proteins normiert. n = 3.

Zusammen mit den Daten vom Einfluss des C-terminalen Peptids auf die hTPH-Aktivität lässt sich vermuten, dass die Verringerung bzw. das Fehlen eines Effektes beim Oligomerisierungsexperiment möglicherweise durch einen raschen proteolytischen Abbauprozess des Peptids zu erklären ist. Dieser führt im Aktivitätsexperiment bereits nach 30 min wieder zu einer Aktivitätsanhebung und zerstört während der 4 stündigen Koimmunopräzipitation vermutlich das vorhandene Peptid und somit einen möglicherweise vorhandenen Effekt vollständig.

### 3.2.4 Der TPH2-N-Terminus

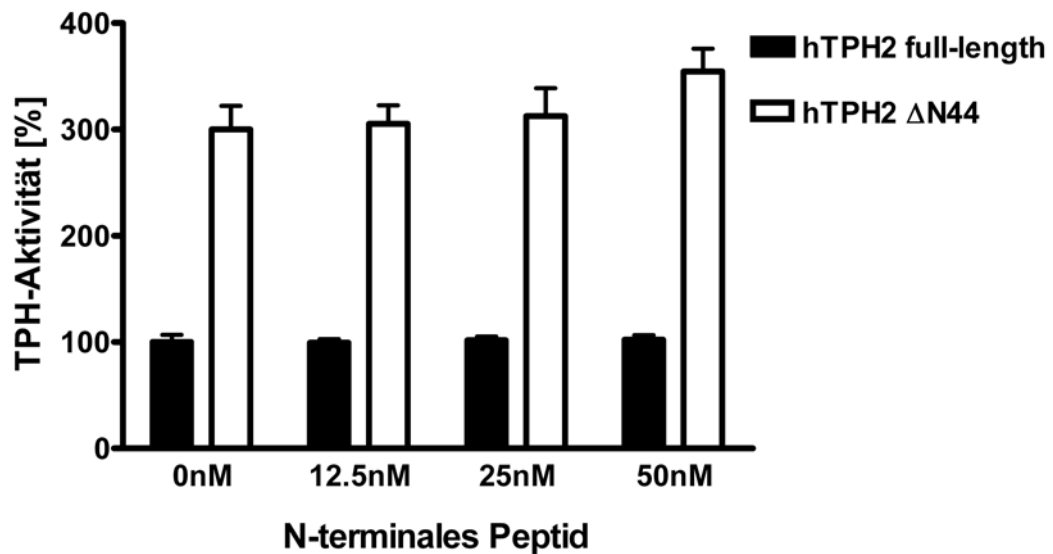
#### 3.2.4.1 Auswirkung einer N-terminalen Deletion auf die TPH2-Aktivität

Die Deletion der ersten 44 Aminosäuren der hTPH2, welche bei der hTPH1 nicht vorhanden sind, führte zu einer 3- (BH4) bzw. 4-fachen (6MPH4) Erhöhung des  $V_{\max}$  im Vergleich zum full-length TPH2-Enzym (Tab. 31). Der  $K_m$  blieb unverändert (BH4) bzw. halbierte (6MPH4) sich (Tab. 32). Die Deletion der 44 Aminosäuren führte also in jedem Fall zu einer erheblichen Steigerung der TPH2-Aktivität.

#### 3.2.4.2 Effekt von N-terminalem Peptid auf die TPH2-Aktivität

Um zu klären, ob der N-Terminus seinen inhibierenden Effekt auf die TPH2-Aktivität möglicherweise über eine Interaktion mit anderen TPH2-Domänen oder die Bindung von im Lysat befindlichen aktivierenden/inhibierenden Faktoren bewerkstelligt, wurde ein zu den ersten 44 Aminosäuren der hTPH2 homologes synthetisches Peptid ( $M_1$  bis  $N_{44}$ ) zum

Reaktionsgemisch gegeben. Aber weder die Aktivität der full-length hTPH2 noch die der hTPH2ΔN44 konnte signifikant beeinflusst werden (Abb. 31).

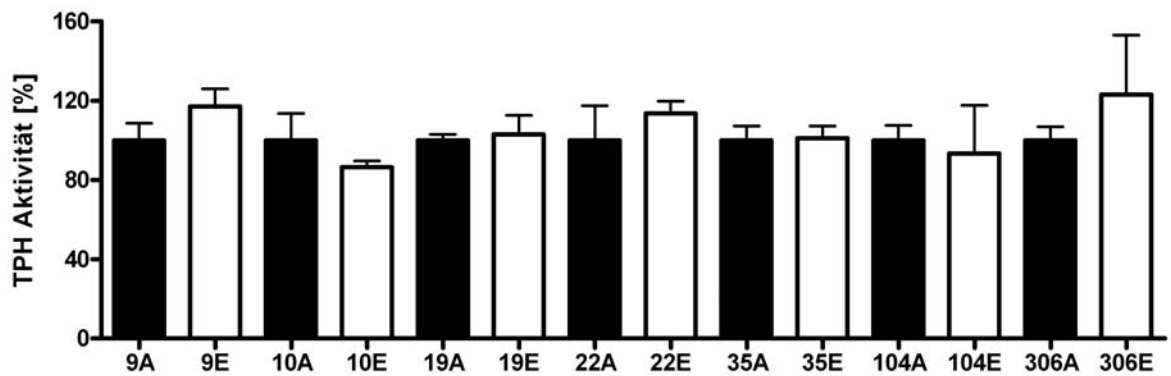


**Abb. 31: Auswirkung eines 44 Aminosäuren langen N-terminalen Peptids auf die Aktivität der hTPH2fl und hTPH2Δ44.** Das Lysat der mit hTPH2fl bzw. hTPH2Δ44 transfizierten COS7 Zellen wurde zunächst für 1 h bei 4°C mit unterschiedlichen Konzentrationen N-terminalen Peptids inkubiert. Anschließend wurden diese vorbehandelten Lysate im TPH-Aktivitätsassays zusammen mit Trp (400 µM) und 6MPH4 (250 µM) eingesetzt. Das während des Assays gebildete 5-HTP wurde mittels HPLC Messung quantifiziert. n = 6.

### 3.2.5 Phosphomutanten der TPH2

#### 3.2.5.1 Aktivität der Phosphomutanten

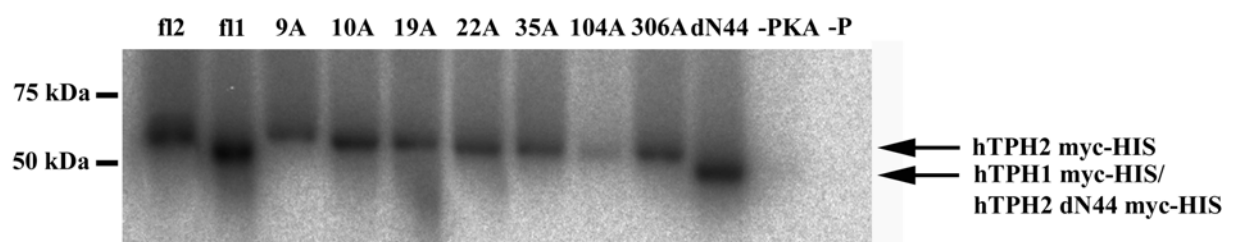
Für die TPH1 ist bekannt, dass eine Phosphorylierung an den Aminosäuren S<sub>58</sub> und S<sub>260</sub> zusammen mit der Bindung von 14-3-3 Proteinen zu einer Aktivitätssteigerung führt (Banik et al., 97). Um zunächst die basale Auswirkung einer Phosphorylierung auf die Aktivität der hTPH2 zu testen, wurden Phosphomutanten der zu den Ser58 und Ser260 der TPH1 homologen Aminosäuren Ser104 und Ser306 der TPH2 erstellt. Da der N-Terminus als Region besonderen Interesses ebenfalls 5 mögliche Phosphorylierungstellen in Form von 4 Serinen (Ser9, Ser10, Ser19, Ser22) und einem Threonin (Thr35) trägt, wurden auch diese mutiert. Hierbei wurden jeweils eine Alanin- (A) und eine Glutamatmutante (E) erstellt, um eine neutrale (einer fehlenden Phosphorylierung entsprechende) bzw. eine negativ geladene (einer Phosphorylierung entsprechende) Gruppe zu erzeugen. Beim Vergleich der beiden Mutanten miteinander konnte an keiner der untersuchten Aminosäurepositionen ein signifikanter Unterschied zwischen der Alanin- und der Glutamatmutante festgestellt werden (Abb. 32).



**Abb. 32: Aktivität der Phosphomutanten.** Das Lysat der mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten COS7 Zellen wurden in 2 Fraktionen unterteilt. Eine Hälfte wurde im Westernblott analysiert, um die vorhandene TPH-Menge zu quantifizieren. Die andere Hälfte wurde im TPH-Aktivitätsassays zusammen mit Trp (400  $\mu$ M) und 6MPH4 (250  $\mu$ M) eingesetzt. Das während des Assays gebildete 5-HTP wurde mittels HPLC Messung quantifiziert und mit Hilfe der im Westernblott bestimmten TPH-Proteinmengen normiert. n = 6.

### 3.2.5.2 Phosphorylierung der TPH und durch PKA

Um den Phosphorylierungszustand der TPH2 genauer zu untersuchen, wurden die hTPH2-Alaninmutanten A9, A10, A19, A22, A104, A306, die full-length hTPH1 und 2 und die hTPH2  $\Delta$ N44 Mutante mit Hilfe der PKA und [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP phosphoryliert. Keine der Mutanten konnte die Phosphorylierung der TPH2 komplett verhindern. Allerdings schien die Alaninmutante der Position Ser104 zu einer deutlichen Verminderung der Phosphorylierbarkeit der TPH2 zu führen (Abb. 33). Somit steht zumindest fest, dass die TPH2 durch die PKA phosphoryliert werden kann, und dass diese Phosphorylierung sich nicht auf eine einzelne Position beschränkt, sondern mehrere Positionen betrifft, wobei es sich bei Ser104 um ein bevorzugtes PKA-Ziel zu handeln scheint.

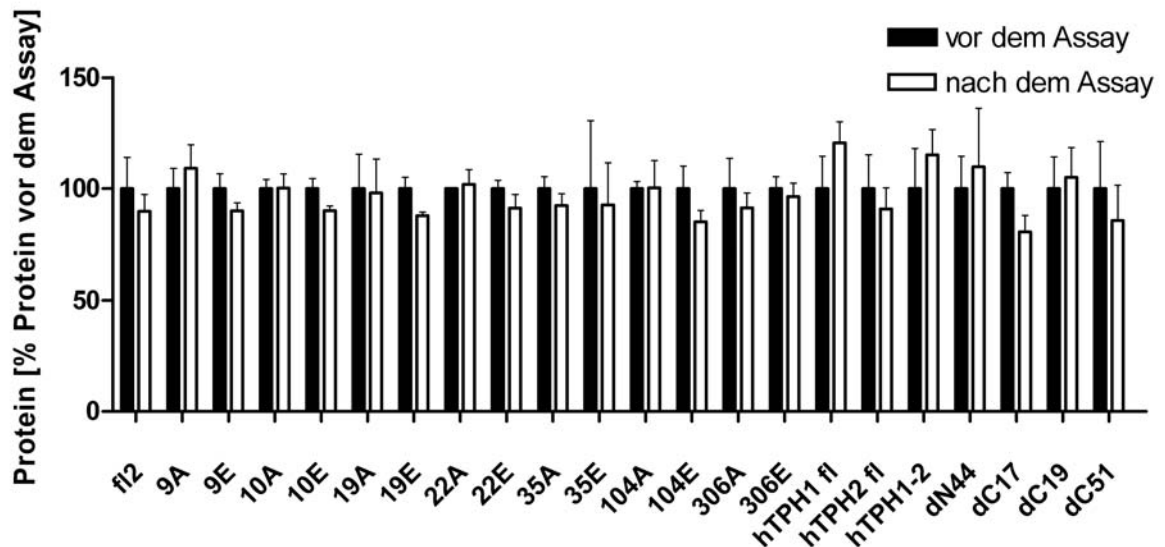


**Abb. 33: Phosphorylierungszustand der TPH1 und 2.** Die Alaninmutanten A9, A10, A19, A22, A104, A306, die  $\Delta$ N44 Mutante und die full-length hTPH1 und 2 wurden in den pcDNA3.1 myc-HIS inseriert, in COS7 Zellen überexprimiert und mit Hilfe von myc-Beads aufgereinigt. Die gereinigten Lysate wurden mit Hilfe der PKA und [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP phosphoryliert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. - P: ohne [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP; - PKA: ohne PKA; f1: full-length hTPH1 myc-HIS; f2: full-length hTPH2 myc-HIS; dN44: hTPH2 $\Delta$ N44 myc-HIS; 9A – 306A: Alaninmutanten der angegebenen Serin- bzw. Threoninpositionen der full-length hTPH2 myc-HIS.

### 3.2.5.3 Stabilität der TPH-Isozyme und ihrer Mutanten

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Phosphorylierungs- und Deletionsmutanten möglicherweise während des 45minütigen Assays in unterschiedlicher Stärke von

proteolytischen Abbauprozessen betroffen waren, wurden die Proteinmengen vor und nach dem Assay miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass keine der Mutanten einem signifikanten Abbauprozess unterlag (Abb. 34).



**Abb. 34: Stabilität der Mutanten.** Mit den jeweiligen Konstrukten transfizierte COS7 Zellen wurden nach dem Protokoll des TPH-Aktivitätsassays geerntet. Das Lysat wurde in 2 Fraktionen geteilt. Eine wurde sofort eingefroren (vor dem Assay), die andere wie im TPH-Aktivitätsassays zunächst 10 min bei 30°C und anschließend 30 min bei 37°C inkubiert (nach dem Assay). Beide Proteinfraktionen wurden anschließend mittels Westernblott quantifiziert und miteinander verglichen. n = 3.

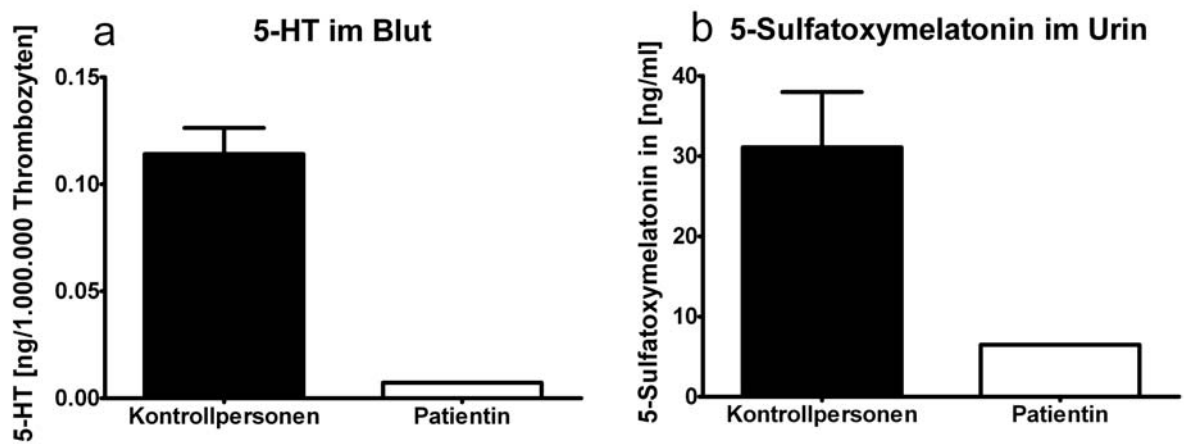
### 3.3 TPH in der Pathogenese

#### 3.3.1 Störungen der serotonergen Systems in einer Patientin

Eine 45 jährige Patientin, die Zeit ihres Lebens unter enormen Störungen des Wach-Schlaf-Zyklus litt und deren Allgemeinmediziner bei ihr eine starke Reduktion des Blut-5-HT-Levels festgestellt hatte, wandte sich mit der Bitte um genauere Untersuchung ihrer „Erkrankung“ an unser Labor. Wir führten zunächst eine genaue Bestimmung des 5-HT-Gehaltes ihres Blutes und anschließend eine Messung des Melatoningehaltes in Form des Melatoninmetaboliten Sulfatoxymelatonin im Urin durch.

##### 3.3.1.1 Serotonin und Melatoninmessung in der Patientenproben

Die Serotoninmessung ergab, dass in den Thrombozyten der Patientin nahezu kein 5-HT vorhanden war (Abb. 35a). Als mögliche Erklärung hierfür kam eine die TPH1-Aktivität stark beeinflussende Mutation in Frage, da die TPH1 die Quelle des in den enterochromaffinen Zellen synthetisierten und später an das Blut abgegebenen 5-HT ist.



**Abb. 35: Serotonin (a) und Sulfatoxymelatonin (b).** (a) Der 5-HT-Gehalt von aus dem Gesamtblut isolierten Thrombozyten wurden mittels HPLC Messung bestimmt und auf die Anzahl der Thrombozyten normiert. (b) Der Sulfatoxymelatoniningehalt von Morgenurin wurde in Proben der Patientin und mehrerer Kontrollpersonen mittels ELISA bestimmt.  $n_{\text{Kontrollen}} = 3$ .

Zunächst sollte aber die Melatoninsynthese der Patientin untersucht werden, welche bei einem durch Komplettausfall der TPH1 bedingtem Fehlen von 5-HT ebenfalls nicht nachweisbar sein sollte.

Es konnten allerdings niedrige Mengen des Melatoninmetaboliten Sulfatoxymelatonin im Urin der Patientin nachgewiesen werden (Abb. 35b). Dies ließ vermuten, dass das Fehlen von 5-HT im Blut nicht durch einen Fehler bei der 5-HT-Synthese, sondern durch eine Störung der Serotoninaufnahme oder -speicherung in die/den Thrombozyten zu erklären war.

Um die Frage zu klären, ob nun eine Störung der TPH1- oder SERT-Funktion in Form einer Mutation in der kodierenden Sequenz des *Tph1*- oder *Sert*-Gens vorlag, wurden alle Exons dieser Gene in der genomischen Patienten-DNA sequenziert.

### 3.3.1.2 Genotypisierung der Patientin

#### 3.3.1.2.1 TPH1

Die Sequenzierung der *hTph1*-Exons 1-10 der genomischen DNA der Patientin mit Hilfe der in den vorausgehenden und folgenden Introns hybridisierenden Primer hTPH1 Exon1-10 for/rev zeigte keinerlei Veränderungen in der DNA-Sequenz der Patientin im Vergleich zum GenBank Eintrag für die *hTph1* (N\_004179).

#### 3.3.1.2.2 SERT

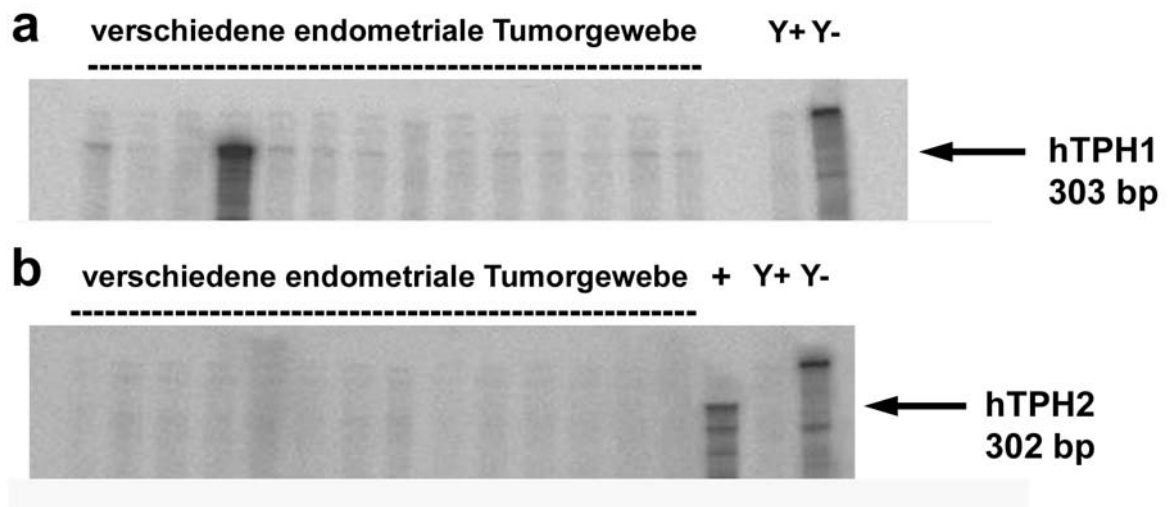
Auch bei der Sequenzierung der *hSert* Exons 1-13 der genomischen DNA der Patientin mit Hilfe der in den vorausgehenden und folgenden Introns hybridisierenden Primer hSERT Exon1-13 for/rev konnten keine Veränderungen im Vergleich zum im Vergleich zum GenBank Eintrag für den *hSert* (N\_001045) nachgewiesen werden.



### 3.3.2 TPH in endometrialen Karzinomen

#### 3.3.2.1 TPH-Expression in endometrialen und myometrialen Gewebeproben von endometrialen Tumoren

16 humane histologische Proben von gutartigen und bösartigen endometrialen Tumoren wurden hinsichtlich der Expression von TPH1- und TPH2-mRNA untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass keiner der Tumore TPH2 exprimierte (Abb. 36b). TPH1-mRNA hingegen konnte auf einem niedrigen Level in vielen der Proben detektiert werden. In einem Tumorgewebe war sogar eine starke Expression nachweisbar (Abb. 36a).

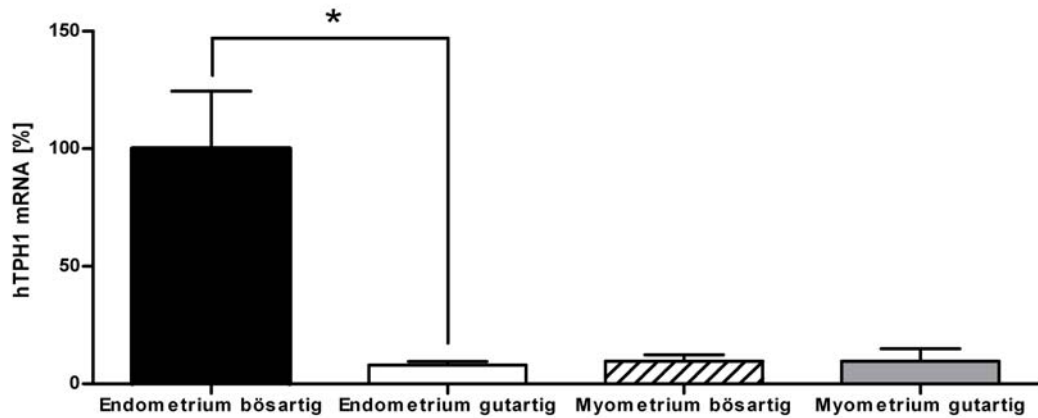


**Abb. 36: hTPH1- (a) und hTPH2-Expression (b) in verschiedenen Tumorgeweben des Uterus.** In einem RPA wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA von 14 Tumorgeweben mit 20.000 cpm der hTPH1- (a) bzw. hTPH2-Sonde (b) hybridisiert. Die Y<sup>+</sup>- und Y<sup>-</sup>-Spur enthielten 20 µg verdauter bzw. unverdauter Hefe-tRNA, die + Spur enthält eine TPH2-Positivkontrolle.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine wesentlich größere Gruppe von 149 Tumorgeweben hinsichtlich ihrer TPH1-Expression untersucht. Die Proben konnten durch histologische Untersuchungen in folgende 4 Gruppen unterteilt werden:

- gutartiges Tumorgewebe des myometrialen Uterusbereiches (Gruppe 1)
- gutartiges Tumorgewebe des endometrialen Uterusbereiches (Gruppe 2)
- bösartiges Tumorgewebe des myometrialen Uterusbereiches (Gruppe 3)
- bösartiges Tumorgewebe des endometrialen Uterusbereiches (Gruppe 4)

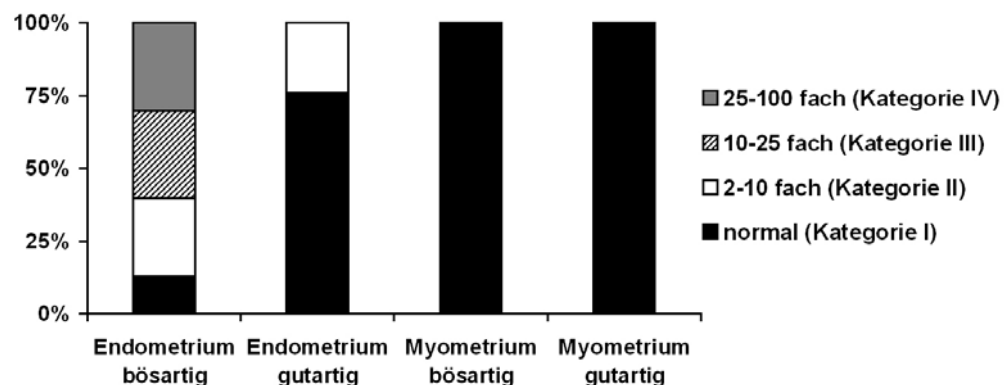
Die Untersuchung ergab, dass die bösartigen Tumorgewebe des endometrialen Uterusbereiches (Gruppe 4) eine signifikant erhöhte TPH1-Expression zeigten. In den Geweben aller anderen Gruppen war nahezu keine TPH1-mRNA nachweisbar (Abb. 37).



**Abb. 37: TPH1-Expression in Tumorgeweben des Uterus.** In einem RPA wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA der verschiedenen Tumorgeweben mit 20.000 cpm der hTPH1-Sonde und 7500 cpm der hGAPDH-Sonde hybridisiert. Das TPH1-Signal wurde anschließend auf das GAPDH Signal normiert. \*:  $p > 0,05$ .

Bei näherer Betrachtung der Gruppe 4 war außerdem auffällig, dass einige Proben eine enorm hohe TPH1-Expression besaßen, andere aber wiederum keine nachweisbaren TPH1-mRNA Mengen enthielten. Daraufhin wurden die Proben der Gruppe 4 ausgehend von der Stärke der TPH1-Expression nochmals in 4 Kategorien unterteilt (Abb. 38). Hierbei wurde der Mittelwert der Gruppen 1,2 und 3 als Normalwert der TPH1-Expression angesehen:

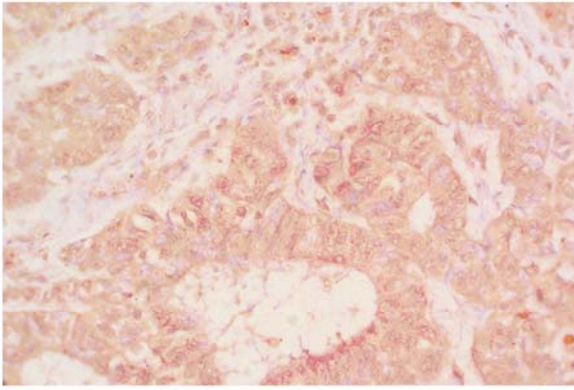
- Kategorie I: 1-fache TPH1-Expression des Normalwertes
- Kategorie II: 2- bis 10-fache TPH1-Expression des Normalwertes
- Kategorie III: 10- bis 25-fache TPH1-Expression des Normalwertes
- Kategorie IV: 25- bis 100-fache TPH1-Expression des Normalwertes



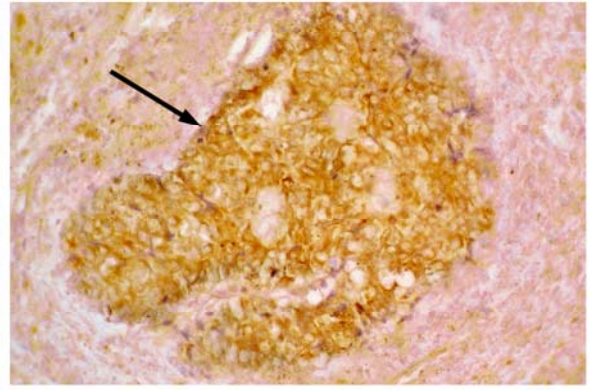
**Abb. 38: Anteil der untersuchten Tumore an den Kategorien I bis IV.**

Die immunhistochemische Untersuchung von Gewebsschnitten der Kategorien I und IV mit TPH-spezifischen Antikörpern bestätigten die im RPA gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der TPH-Expression. In der Kategorie I konnte kaum bzw. nur sehr wenig TPH-Protein nachgewiesen werden. Die Gewebe der Kategorie IV hingegen enthielten viel TPH-Protein (Abb. 39).

**Kategorie I**



**Kategorie IV**

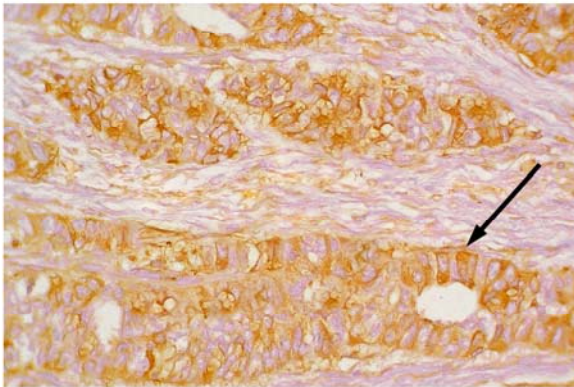


**Abb. 39: TPH-Immunohistochemie in Tumorgeweben des Uterus.** Paraffinschnitte von Tumorgeweben der Kategorien I und IV wurden mit anti-TPH-Antikörper inkubiert.

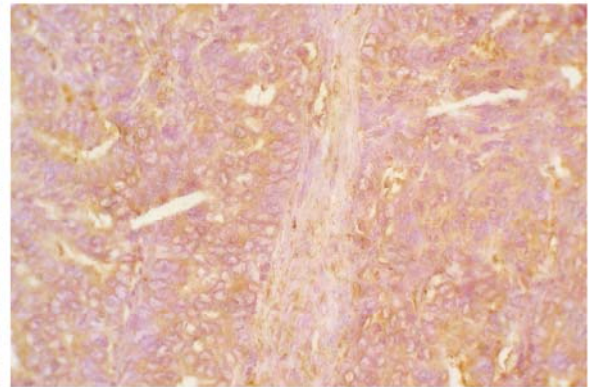
### 3.3.2.2 Serotonin in endometrialen Karzinomen

Entgegen der Vermutung, dass die 5-HT-Level in den Proben mit den Ergebnissen der TPH1-Expression korreliert sein würden, wurde festgestellt, dass die Tumore der Kategorie IV trotz ihrer hohen TPH1-mRNA-Level sehr wenig 5-HT enthielten, die Proben der Kategorie I mit ihrer sehr geringen TPH1-Expression hingegen sehr hohe 5-HT-Mengen beinhalteten (Abb. 40). Dabei war auffällig, dass sich das 5-HT hauptsächlich um die Gefäße herum anordnete.

**Kategorie I**



**Kategorie IV**



**Abb. 40: 5-HT-Immunohistochemie in Tumorgeweben des Uterus.** Paraffinschnitte von Tumorgeweben der Kategorien I und IV wurden mit anti-5-HT-Antikörper inkubiert.

### 3.3.2.3 Morphologische Begutachtung der endometrialen Karzinome

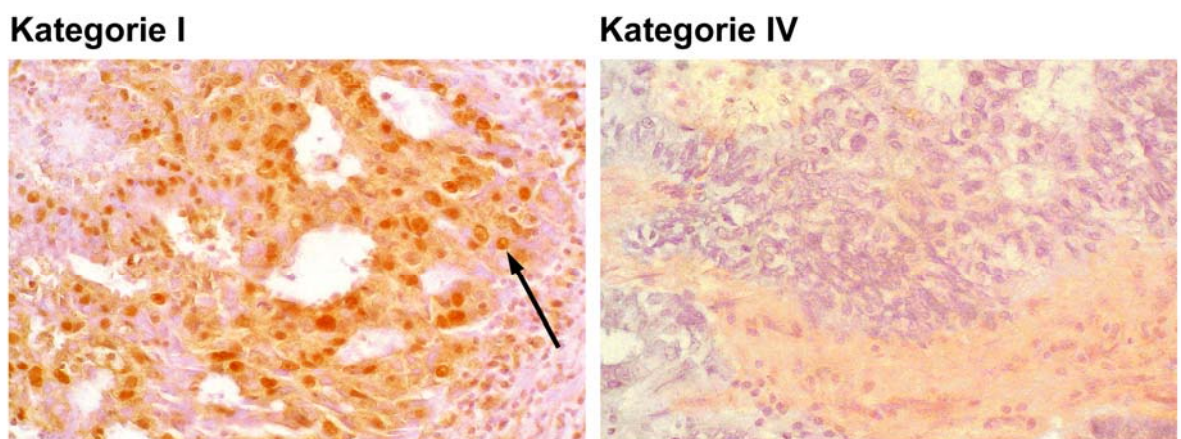
Die Proben der Kategorien I und IV wurden einer histologischen Begutachtung unterzogen, welche die Aggressivität und das Wachstumspotential der Tumore und somit die Prognose für die betroffenen Patienten abschätzen sollte. Dabei wurden das Ausmaß der Tumordinvasion in andere Gewebe, die Differenzierung des Tumors, die Anzahl der Kernschichten, der

Kernpolymorphismen und der Mitoseereignisse berücksichtigt. Hierbei ergab sich folgendes Bild:

- Kategorie I: geringes Wachstumspotential, wenig aggressiv, gute Prognose
- Kategorie IV: hohes Wachstumspotential, sehr aggressiv, schlechte Prognose.

#### 3.3.2.4 Östrogenrezeptoren Immunohistochemie von endometrialen Karzinomen

Ein weiteres Maß für die Aggressivität eines Tumors ist die Expression von Östrogenrezeptoren. Ein hohes Expressionslevel deutet hierbei auf einen aggressiven Tumor mit großem Wachstumspotential, ein niedriges Level auf eine geringere Wachstumsrate hin. In den Tumoren der Kategorie I wurde eine große Anzahl an Östrogenrezeptoren nachgewiesen. Die Kategorie IV hingegen zeigte eine niedrige Expression (Abb. 41). Die Ergebnisse bestätigen also die bereits anhand der morphologischen Begutachtung getroffenen Aussagen.



**Abb. 41: Östrogenrezeptoren Immunohistochemie in in Tumorgewebe des Uterus.** Paraffinschnitte von Tumorgewebe der Kategorien I und IV wurden mit anti-Östrogenrezeptor  $\alpha/\beta$ -Antikörper inkubiert.

#### 3.3.2.5 Signifikante Merkmale der endometrialen Karzinome der Kategorien I und IV

Die endometrialen bösartigen Tumore konnten anhand ihrer TPH1-Expression in 4 Kategorien unterteilt werden. Zusammen mit der Bestimmung der 5-HT-Level und der Prognose für die Patienten ergab sich folgendes Bild (Tab. 33):

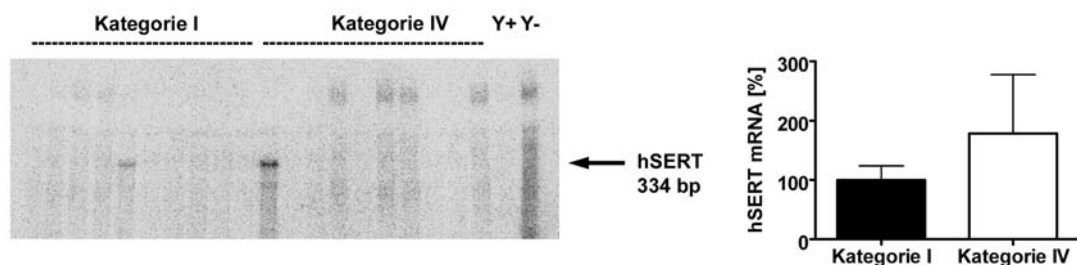
**Tab. 33: Kategorisierung der endometrialen Tumore.**

	TPH1-Expression	5-HT-Gehalt	Aggressivität
<b>Kategorie I</b>	niedrig	hoch	hoch
<b>Kategorie IV</b>	hoch	niedrig	niedrig

Aus den erhaltenen Ergebnissen ergab sich natürlich die Frage, welche Ursachen für die Diskrepanz zwischen TPH1-Expression und 5-HT-Gehalt verantwortlich waren, wobei sich eine Vielzahl von denkbaren Möglichkeiten ergab. Für die notwendigen weiteren Untersuchungen wurden jeweils die extremsten 10 Vertreter der Kategorien I und IV, also die Tumorgewebe mit der niedrigsten und höchsten TPH1-Expression, ausgewählt.

### 3.3.2.6 SERT-Expression in endometrialen Karzinomen

Der SERT war einer der möglichen Verursacher der beobachteten Widersprüche. Eine hohe SERT-Aktivität könnte für einen 5-HT-Transport aus dem Blut in 5-HT-armes Gewebe verantwortlich sein und dort trotz niedriger TPH1-Expression hohe 5-HT-Level erzeugen. Leider zeigte nur jeweils eines der untersuchten Gewebe aus jeder Kategorie eine detektierbare SERT-Expression, womit der SERT als mögliche Erklärung ausfällt (Abb. 42).



**Abb. 42: SERT-Expression in Kategorie I und IV.** In einem RPA wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA der verschiedenen Tumorgeweben mit 20.000 cpm der hSERT-Sonde und 7500 cpm der hGAPDH-Sonde hybridisiert. Das SERT-Signal wurde anschließend auf das GAPDH-Signal normiert. Die Y<sup>+</sup>- und Y<sup>-</sup>-Spur enthielten 20 µg verdauter bzw. unverdauter Hefe-tRNA. n = 10.

### 3.3.2.7 NAT-Expression in endometrialen Karzinomen

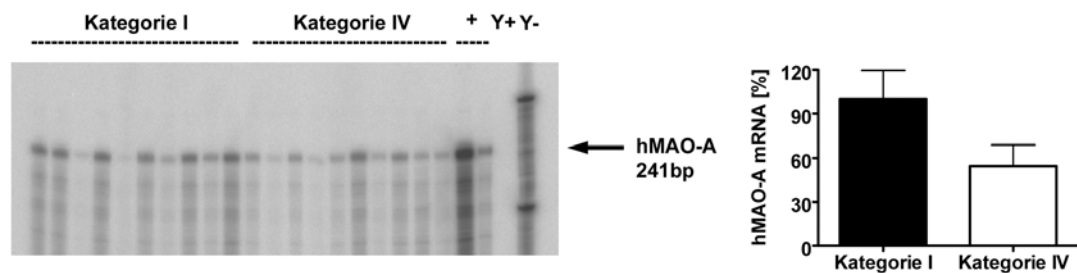
Die NAT als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Metabolisierung von 5-HT zu Melatonin bot eine weitere mögliche Erklärung. Eine sehr hohe NAT-Aktivität könnte vorhandenes 5-HT sofort in Melatonin umsetzen und somit trotz hoher TPH1-Level 5-HT nur in geringen Mengen nachweisbar machen. Umgekehrt könnte eine geringe bzw. fehlende NAT Aktivität bei geringer TPH1-Expression zu einer Akkumulation des gebildeten 5-HT im Gewebe führen. Die NAT-Expression in den Tumoren war allerdings so niedrig, dass sie nicht im RPA nachgewiesen werden konnte. Ein im Vergleich zur TPH1 so niedrig exprimiertes Enzym ist damit eine unwahrscheinliche Erklärung für die beobachteten niedrigen 5-HT-Level in den Kategorie IV Geweben.

### 3.3.2.8 MAO-A-Expression in endometrialen Karzinomen

Die MAO-A als 5-HT-abbauendes Enzym könnte bei hoher Aktivität gebildetes 5-HT sofort abbauen und somit nicht mehr nachweisbar machen. Im umgekehrten Fall könnte eine



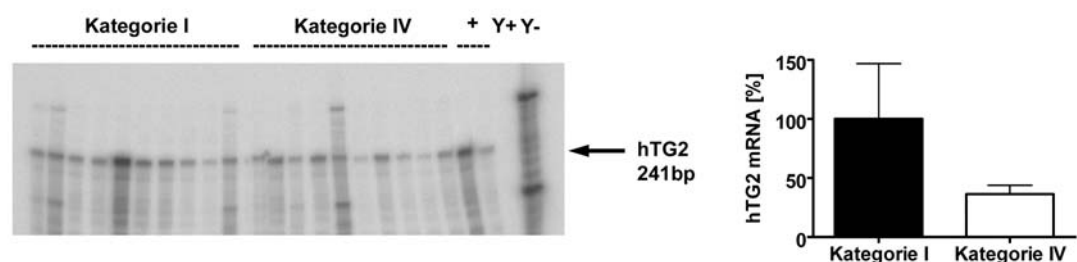
fehlende Aktivität eine 5-HT-Ansammlung bewirken. Aber auch bei der MAO-Expression konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kategorie I und IV festgestellt werden (Abb. 43).



**Abb. 43: MAO-A-Expression in Kategorie I und IV.** In einem RPA wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA der verschiedenen Tumorgewebe mit 20.000 cpm der hMAO-A-Sonde und 7500 cpm der hGAPDH Sonde hybridisiert. Das MAO-A-Signal wurde anschließend auf das GAPDH-Signal normiert. Die Y<sup>+</sup>- und Y<sup>-</sup>-Spur enthielten 20 µg verdauter bzw. unverdauter Hefe-tRNA. n = 10.

### 3.3.2.9 TG2-Expression in endometrialen Karzinomen

Die TG2 ist dazu in der Lage, 5-HT an die Glutaminreste verschiedener Proteine wie z.B. RhoA zu binden. Ein auf diese Weise modifiziertes RhoA Protein wird verstärkt ubiquityliert und unterliegt einem raschen Abbauprozess durch das Proteasom (Guilluy et al., 07). Eine hohe TG2-Aktivität könnte also in großen Mengen gebildetes 5-HT durch Serotonylierung binden, dem Proteasomabbau zuführen und einen Nachweis unmöglich machen. Ein Fehlen von TG2 hingegen würde ungebundenes, detektierbares 5-HT zurücklassen. Im RPA konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen der TG2-Expression in Kategorie I und IV nachgewiesen werden (Abb. 44).

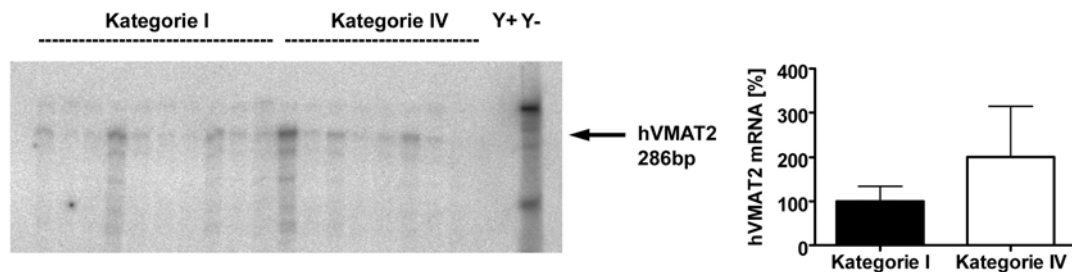


**Abb. 44: TG2-Expression in Kategorie I und IV.** In einem RPA wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA der verschiedenen Tumorgewebe mit 20.000 cpm der hTG2-Sonde und 7500 cpm der hGAPDH-Sonde hybridisiert. Das TG2-Signal wurde anschließend auf das GAPDH-Signal normiert. Die Y<sup>+</sup>- und Y<sup>-</sup>-Spur enthielten 20 µg verdauter bzw. unverdauter Hefe-tRNA. n = 10.

### 3.3.2.10 VMAT1- und 2-Expression in endometrialen Karzinomen

Durch den Transport von 5-HT via VMAT1 oder 2 in die Vesikel wird das 5-HT vor Abbauprozessen im Zytosol geschützt. Eine hohe Transporteraktivität würde folglich zu einer Anreicherung von 5-HT in den Vesikeln führen. Eine geringe VMAT-Aktivität hätte den

schnellen Abbau des frisch gebildeten 5-HT zu Folge. Der VMAT1 wurde in den Tumoren so gering exprimiert, dass er im RPA nicht nachweisbar war. Die VMAT2-mRNA war zwar nachweisbar, aber es konnte kein Expressionsunterschied zwischen den beiden Kategorien festgestellt werden (Abb. 45).



**Abb. 45: VMAT2-Expression in Kategorie I und IV.** In einem RPA wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA der verschiedenen Tumorgewebe mit 40.000 cpm der VMAT2-Sonde und 7500 cpm der hGAPDH-Sonde hybridisiert. Das VMAT2-Signal wurde anschließend auf das GAPDH-Signal normiert. Die Y<sup>+</sup>- und Y<sup>-</sup>-Spur enthielten 20 µg verdauter bzw. unverdauter Hefe-tRNA. n = 10.

### 3.3.2.11 Zusammenfassung der Merkmale der endometrialen Karzinome der Kategorien I und IV

Zusammenfassend ergab sich bei der Untersuchung der endometrialen Karzinome der Kategorien I und IV folgendes Bild (Tab. 34):

**Tab. 34: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen in den Tumorkategorien I und IV.**

	TPH	5-HT	SERT	MAO-A	TG2	VMAT1	VMAT2	NAT	Wachstums- potential	Östrogen- Rezeptoren
I	↓	↑	↔	↔	↔	↔	n.n.	n.n.	↑	↑
IV	↑	↓							↓	↓

↑: hoch; ↓: niedrig; ↔: kein Unterschied zwischen Kategorie I und IV; n.n.: im RPA nicht nachweisbar.

Es konnte keine Erklärung für die beobachtete Diskrepanz zwischen TPH1-Expression und 5-HT-Gehalt der endometrialen Tumore gefunden werden.

### 3.3.3 Einfluss eines mTPH2 SNPs auf das serotonerge System und Verhalten von Mäusen

Zhang (Zhang et al., 04) konnte in der mTPH2 einen C1473G Polymorphismus nachweisen, der in TPH2-transfizierten PC12 Zellen zu einer deutlichen Reduktion des 5-HT-Gehaltes führt. Ferner stellte er fest, dass Mausstämmen, welche das TPH2-Allel 1473G homozygot in sich tragen im Vergleich zu homozygoten 1473C Stämmen ein reduziertes 5-HT-Level und

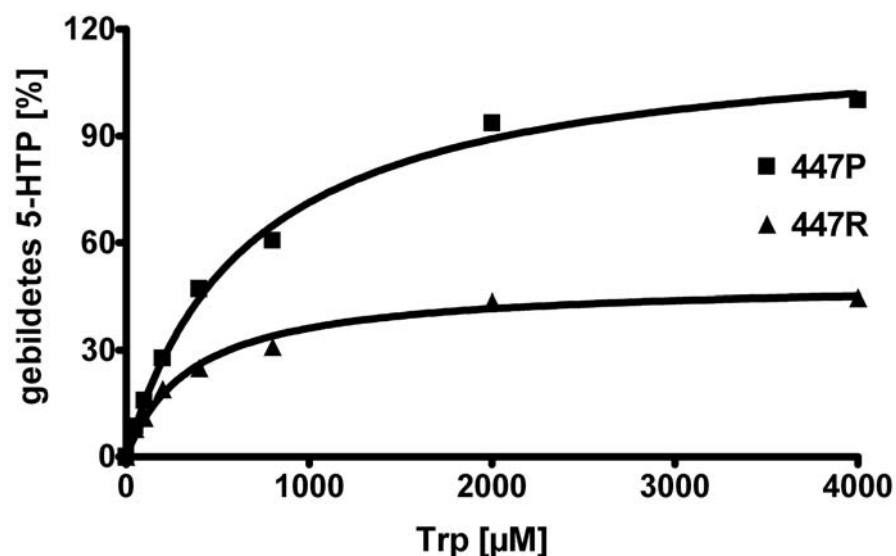
eine verminderte 5-HT-Syntheserate im Gehirn haben. Einige dieser Stämme zeigten signifikante, vermutlich 5-HT bedingte Verhaltensunterschiede (Lucki et al., 01). Folglich sollte untersucht werden, ob die Unterschiede in den 5-HT-Parametern und im Verhalten der Stämme tatsächlich durch die polymorphismusbedingte Aktivitätsveränderung der TPH2 oder vielleicht lediglich durch Variationen des genetischen Backgrounds bedingt sind. Zunächst sollten die biochemischen Eigenschaften der von Zhang beschriebenen unterschiedlichen TPH2-Formen genauer untersucht werden.

### 3.3.3.1 Klonierung der TPH-Allelformen *mTPH2<sub>1473C</sub>* und *mTPH2<sub>1473G</sub>*

Die kompletten cDNAs der *mTPH2<sub>1473C</sub>* und *mTPH2<sub>1473G</sub>* wurden auf Grundlage der Hirn-RNA von C57BL/6 und DBA/2 Mäusen amplifiziert, in den eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert und in COS7 Zellen überexprimiert.

### 3.3.3.2 Bestimmung der kinetischen Parameter der *mTPH2<sub>447P</sub>* und *mTPH2<sub>447R</sub>*

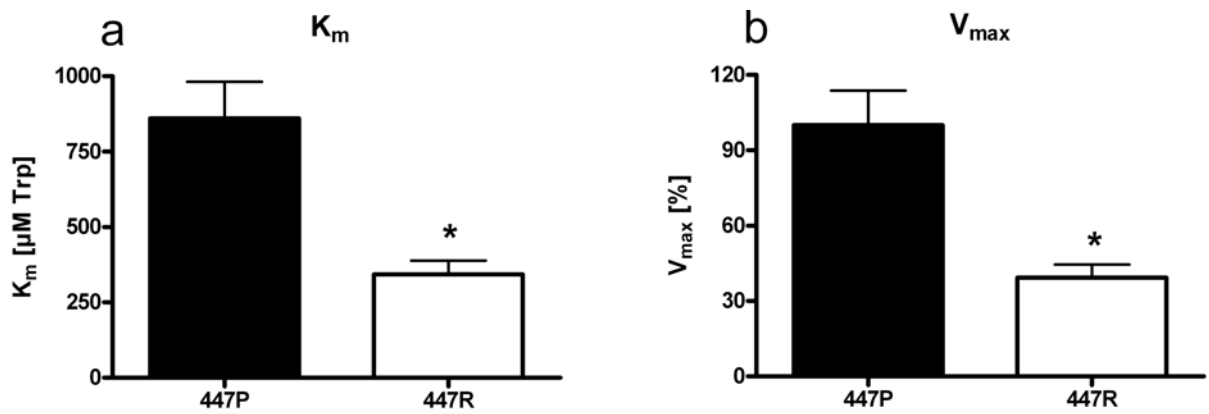
Die Michaelis-Menten Kinetiken der *mTPH2<sub>447P</sub>* und *mTPH2<sub>447R</sub>* wurden unter Nutzung des synthetischen Kofaktor 6MPH4 bestimmt (Abb. 46).



**Abb. 46: Michaelis-Menten-Kinetiken der *mTPH2<sub>447P</sub>* und *mTPH2<sub>447R</sub>*.** Das Gesamtlysate von mit *mTPH2<sub>447P</sub>* bzw. *mTPH2<sub>447R</sub>* transfizierten COS7 Zellen wurde im TPH-Aktivitätsassay zusammen mit dem synthetischen Kofaktor 6MPH4 und verschiedenen Trp-Konzentrationen von 0 bis 4000 µM für 30 min bei 37°C inkubiert. Das gebildete 5-HTP wurde mittels HPLC Messung quantifiziert und in Prozent des Maximalwertes der *mTPH2<sub>447P</sub>* angegeben. Die Michaelis-Menten-Kinetiken wurden mit dem Programm GraphPadPrism erstellt. n = 6.

Dabei stellte sich heraus, dass die *mTPH2<sub>447R</sub>* mit 342 µM Trp zwar gegenüber der *mTPH2<sub>447P</sub>* mit 860 µM Trp einen geringeren  $K_m$  besitzt, dass ihr  $V_{max}$ -Wert aber nur 40 % der *mTPH2<sub>447P</sub>* erreicht (Abb. 47). Die *mTPH2<sub>447R</sub>* ist also vor allem bei hohen Tryptophankonzentrationen das wesentlich aktivere der beiden Enzyme.



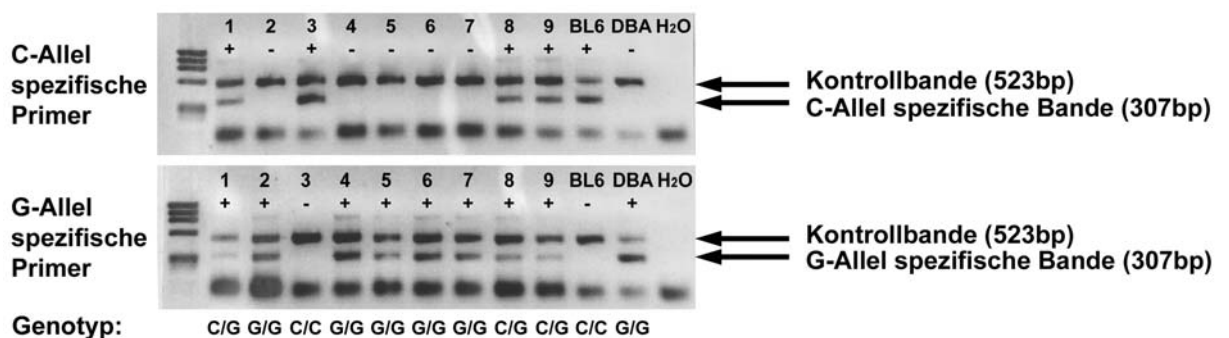


**Abb. 47:  $K_m$ - (a) und  $V_{max}$ -Werte (b).** Das Gesamtlisat von mit mTPH2<sub>447P</sub> bzw. mTPH2<sub>447R</sub> transfizierten COS7 Zellen wurde im TPH-Aktivitätsassay zusammen mit dem synthetischen Kofaktor 6MPH4 (250  $\mu$ M) und verschiedenen Trp-Konzentrationen von 0 bis 4000  $\mu$ M für 30 min bei 37°C inkubiert. Das gebildete 5-HTP wurde mittels HPLC Messung quantifiziert. Die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte wurden mittels Michaelis-Menten-Kinetik-Funktion des Programms GraphPadPrism berechnet. Die  $V_{max}$ -Werte wurden über eine Westernblottquantifizierung der TPH2-Proteinmenge auf Prozent der  $V_{max}$  der mTPH2<sub>447P</sub> normiert. n = 3; \*: p > 0,05.

### 3.3.3.3 Rückkreuzung auf des 1473G-Allels auf den C57BL/6

#### Background

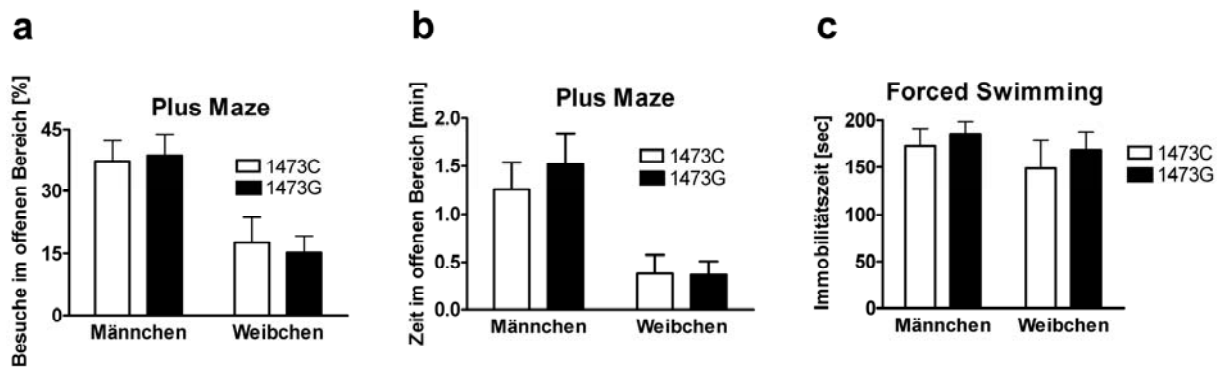
Um zu überprüfen, ob die von Zhang (Zhang et al., 04) beobachteten Unterschiede im 5-HT-Gehalt der Gehirne und im Verhalten der C-Allel und G-Allel Mausstämmen tatsächlich auf den C1473G Polymorphismus im *mTph2*-Gen zurückzuführen sind, oder ob es sich lediglich um einen Effekt des genetischen Backgrounds der verschiedenen Stämme handelt, wurde das 1473G-Allel des DBA/2 Stammes über 8 Generationen auf den C57BL/6 Background zurückgekreuzt. Die Tiere jeder Generation wurden mittels Genotypisierungs-PCR auf das Vorhandensein des 1473C bzw. 1473G Allels untersucht (Abb.48). Die heterozygoten G/C Tiere wurden ausgewählt und mit homozygoten C57BL/6 C/C Tieren weiterverpaart. Die heterozygoten C/G Tiere der 8. Generation wurden untereinander verpaart, um homozygote C/C und G/G Nachkommen für die folgenden Versuche zu erzeugen.



**Abb. 48: Beispiel einer C1473G Genotypisierungs-PCR.** Bei einer PCR wurde die genomische DNA aus Schwanzbiopsien der zu testenden Tiere (1-8) zusammen mit zwei TPH2-Kontrollprimern und einem für das C-Allel (oberes Gel) bzw. das G-Allel spezifischem Primer eingesetzt. Die Kontrollprimer lieferten jeweils eine Bande von 523 bp, die allelspezifischen Primer eine Bande von 307 bp. BL6: TPH2<sub>1473C</sub>-Positivkontrolle von C57BL/6 Mäusen ; DBA: TPH2<sub>1473G</sub>-Positivkontrolle von DBA/2 Mäusen.

### 3.3.3.4 Verhaltenstests mit 1473C/C und 1473G/G Mäusen

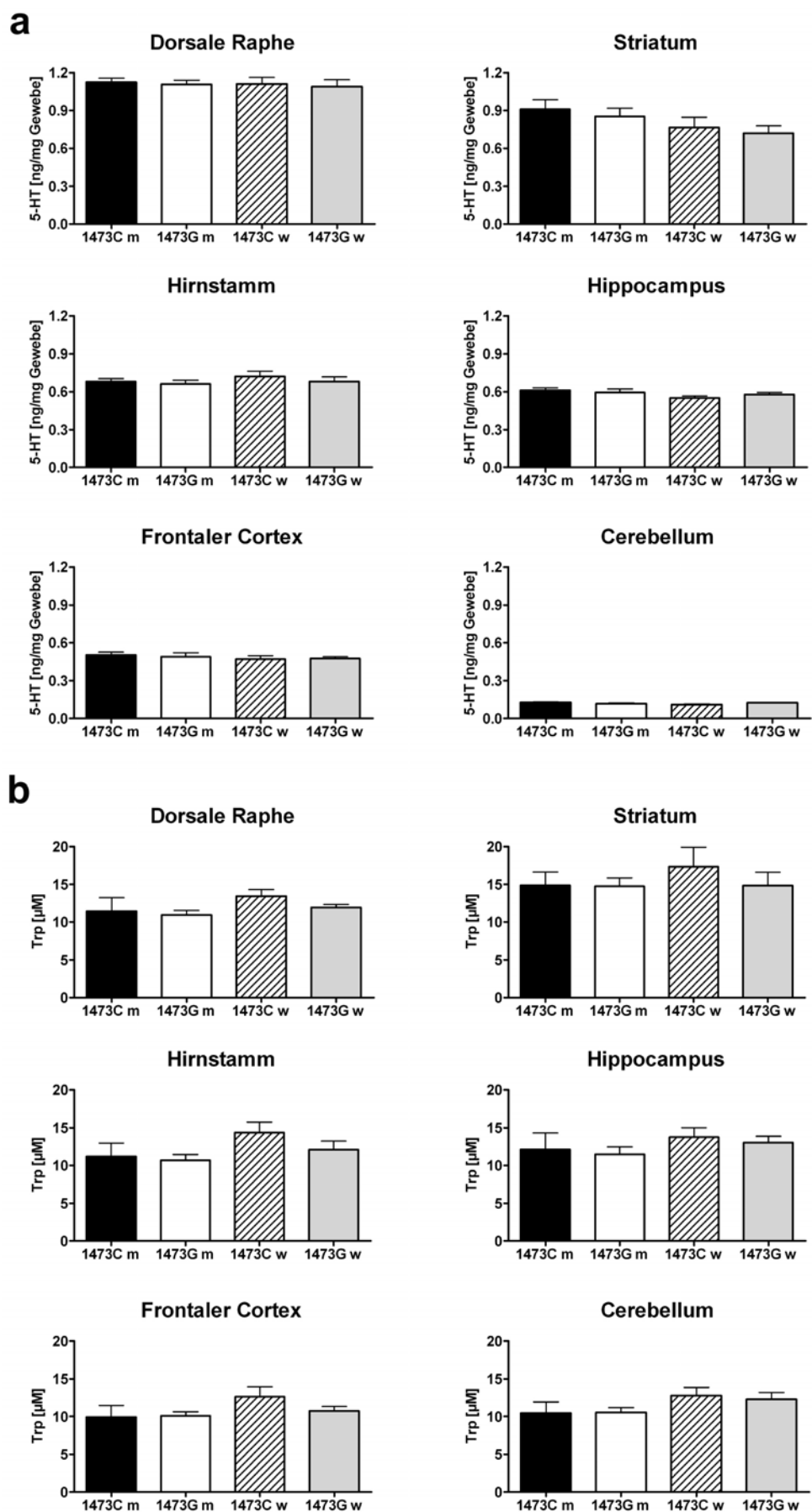
Die homozygoten 1473C/C und 1473G/G Mäuse wurden zu Bestimmung ihres Angst- und depressionsähnlichen Verhaltens zwei Verhaltenstests unterzogen: dem Plus Maze Test (PM) und dem Forced Swimming Test (FST). Dabei konnten sowohl im FST (Abb. 49c) als auch im PM (Abb. 49a, b) keine signifikanten Unterschiede zwischen den 1473C/C und 1473G/G Tieren festgestellt werden.



**Abb. 49: Plus Maze und Forced Swimming Test.** 1473C/C und 1473G/G Männchen und Weibchen wurden in zwei Verhaltenstests bezüglich ihres Angst- und depressionsähnlichen Verhaltens untersucht. Männchen:  $n_{\text{FST}} = 15$ ,  $n_{\text{PM}} = 22$ ; Weibchen:  $n_{\text{FST/PM}} = 6$ .

### 3.3.3.5 5-HT-Gehalt der Hirne von 1473C/C und 1473G/G Mäusen

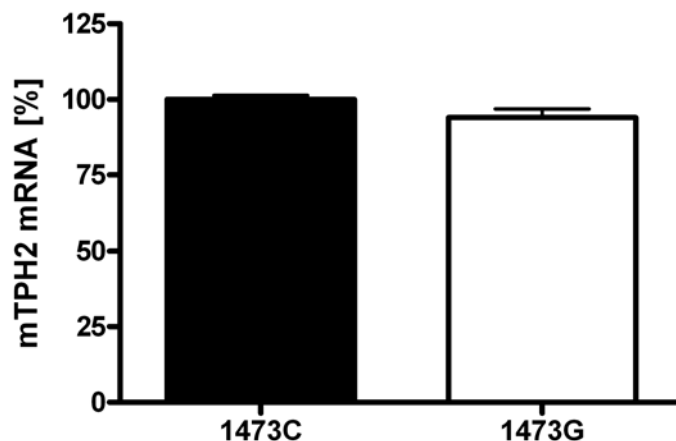
Um eventuelle Unterschiede im 5-HT-Gehalt in den Hirnen der untersuchten Tiere festzustellen, wurden die 5-HT-Konzentrationen von 6 verschiedenen Hirnregionen bestimmt. Auch hier konnten weder in Dorsaler Raphe, Striatum, Hirnstamm, Hippocampus, Frontalem Cortex noch im Cerebellum signifikante Unterschiede detektiert werden (Abb. 50). Im Zuge dieser Messungen wurden auch die Tryptophankonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt. Dabei ergab sich in den untersuchten Hirnarealen eine mittlere Tryptophankonzentration von 12-17  $\mu\text{M}$ .



**Abb. 50: 5-HT (a) und Trp (b) in verschiedenen Hirnregionen.** Der 5-HT- und Trp-Gehalt von Dorsaler Raphe, Striatum, Hirnstamm, Hippocampus, Frontalem Cortex und Cerebellum wurden mittels HPLC-Messung bestimmt und auf das Probengewicht normiert. Männchen: n = 8; Weibchen: n = 6.

### 3.3.3.6 TPH2-Expression in den Hirnen von 1473C/C und 1473G/G Mäusen

Da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die mTPH<sub>2447P</sub> und mTPH<sub>2447R</sub> unterschiedliche kinetische Parameter besitzen, sollte überprüft werden, ob die trotz alledem gleichen 5-HT-Level in beiden Mauslinien vielleicht durch eine unterschiedliche Regulation der TPH2-Expression bedingt wurden. Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen dem mTPH2-mRNA-Level im Hirnstamm von 1473C und 1473G Tieren festgestellt werden (Abb. 51).

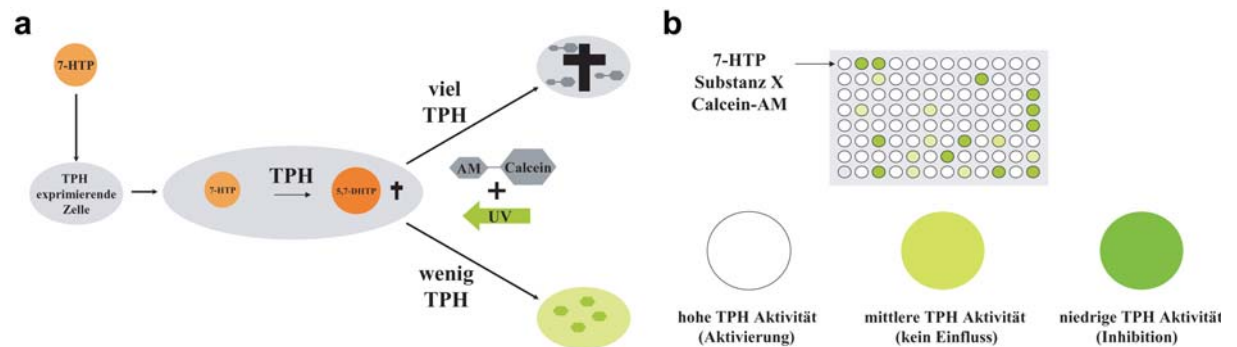


**Abb. 51: TPH2-Expression im Hirnstamm.** In einem RPA wurden jeweils 40 µg Hirnstamm-Gesamt-RNA von weiblichen 1473C und 1473G Mäusen mit 40.000 cpm der mTPH2- und 7500 cpm der mGAPDH-Sonde hybridisiert. Die Normierung der TPH2-Signale erfolgte über das GAPDH-Signal. n = 10.

## 3.4 High-Throughput-Assay zur Bestimmung der TPH-Aktivität

Es sollte ein Assay für die Messung von TPH-Aktivität entwickelt werden, der die Testung des Einflusses von pharmakologischen Substanzen auf die TPH mit relativ hohem Durchsatz ermöglicht. Es war also notwendig ein Verfahren zu etablieren, das im 96-Well-Format und mit einer einfachen Detektionsmethode (wie Fluoreszenzmessung) einsetzbar ist. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Substanz 7-Hydroxytryptophan (7-HTP) beschrieben (Walther et al., 02), welche von der TPH als alternatives Substrat erkannt und in 5,7-Dihydroxytryptophan (5,7-DHTP) umgewandelt wird. 5,7-DHTP wiederum wird von der AAAD zu dem bekannten Neurotoxin 5,7-Dihydroxytryptamin (5,7-DHT) metabolisiert. 7-HTP wird von Zellen durch den ubiquitär exprimierten LAAT aufgenommen, kann seine toxische Wirkung über die Metabolisierung zu 5,7-DHT aber nur dort entfalten, wo eine TPH-Aktivität vorhanden ist. Das Prinzip des Assay sollte nun sein, eine TPH-exprimierende Zelllinie ausfindig zu machen und diese der Substanz 7-HTP auszusetzen. Gleichzeitig sollte die auf ihre TPH-aktivitätsbeeinflussende Wirkung hin zu untersuchende „Substanz X“ hinzu gegeben werden.

Bei der Zugabe einer wirkungslosen „Substanz X“ verbliebe die TPH in ihrem ursprünglichen Aktivitätszustand, würde das Toxin 5,7-DHT aus 5-HTP synthetisieren und die Zellen würden in Folge dessen absterben. Eine die TPH-Aktivität inhibierende „Substanz X“ hingegen würde dazu führen, dass die Zellen 7-HTP nicht zu seinem cytotoxischem Metaboliten umsetzen könnten. Sie würde folglich auch nicht absterben. Im Gegensatz dazu würde eine auf die TPH-Aktivität aktivierend wirkende „Substanz X“ den Zelltod beschleunigen und verstärken.



**Abb. 52: Prinzip des High-Throughput -Assays für die TPH-Aktivitätsbestimmung.**

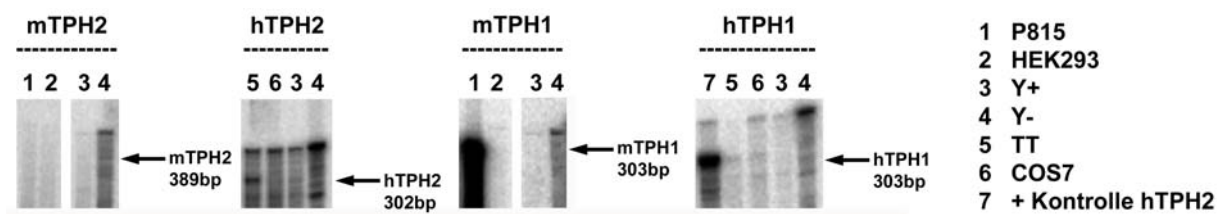
Die Messung des Anteils der toten Zellen sollte über den im Grundzustand inaktiven Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM erfolgen. Der Farbstoff diffundiert in die Zellen und wird dort durch die zelleigene Esteraseaktivität in das stark fluoreszierende Calcein umgewandelt (Anregung bei 490 nm; Emission bei 515 nm). In toten Zellen ist keine Esteraseaktivität mehr vorhanden und Calcein-AM verbleibt in seinem inaktiven Zustand (Abb. 52a). Die gemessene Fluoreszenz sollte folglich proportional zum Vitalitätszustand der Zellen sein, welcher wiederum umgekehrt proportional zur TPH-Aktivität wäre. Eine inhibierende „Substanz X“ würde folglich zu einer hohen Fluoreszenz, eine aktivierende Substanz zu einer sehr schwachen bzw. nicht mehr vorhandenen Fluoreszenz führen. Die Messung der Fluoreszenz sollte in einem 96-Well-Plattenleser erfolgen (Abb. 52b).

### 3.4.1 TPH, 5-HT und 5-HTP in verschiedenen Zelllinien

Zunächst musste eine geeignete Zelllinie mit hoher TPH-Expression und eine Kontrollzelllinie mit fehlender TPH-Aktivität gefunden werden. Idealerweise würden sich eine exklusiv TPH1- und eine ausschließlich TPH2-exprimierende Zelllinie finden lassen.

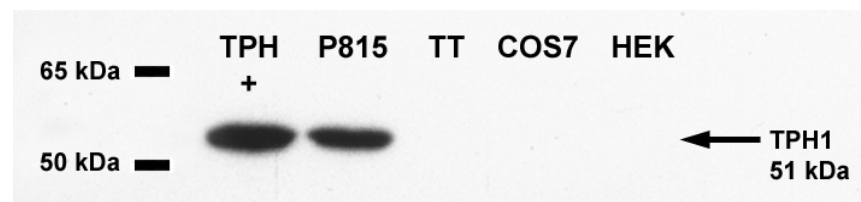
#### 3.4.1.1 TPH1- und TPH2-Expression in verschiedenen Zelllinien

Die Expression von TPH1-mRNA konnte auf einem sehr hohen Level in den murinen P815 Zellen nachgewiesen werden. TPH2-mRNA konnte lediglich auf einem niedrigen Niveau in TT Zellen detektiert werden. COS7 und HEK293 Zellen zeigten weder eine TPH1- noch eine TPH2-Expression (Abb. 53).



**Abb. 53: TPH1- und TPH2-mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien.** In einem RPA wurden jeweils 20 µg zellulärer Gesamt-RNA mit 20.000 cpm der mTPH2-, hTPH2-, mTPH1- oder hTPH1-Sonde hybridisiert. Die Y+ und Y- Spur enthielten 20 µg verdauter bzw. unverdauter Hefe-tRNA.

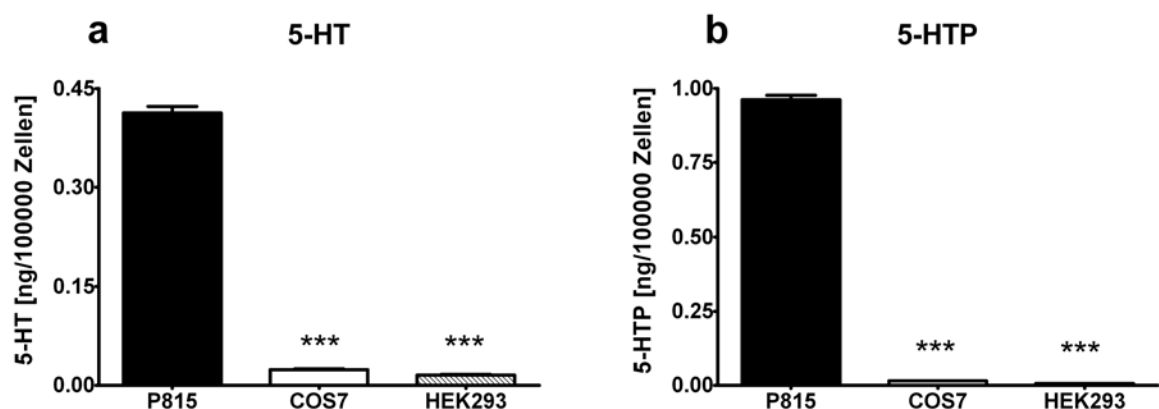
Bei der Überprüfung der TPH-Proteinlevel lag lediglich in P815 Zellen eine detektierbare Proteinmenge vor (Abb. 54).



**Abb. 54: TPH-Protein in verschiedenen Zelllinien.** In einem Westernblott wurden verschiedene Zelllinien mit einem anti-TPH-Antikörper auf ihren TPH Proteingehalt untersucht. Als Positivkontrolle diente eukaryotisch überexprimiertes TPH1-Protein.

#### 3.4.1.2 5-HT und 5-HTP in verschiedenen Zelllinien

Sowohl 5-HT als auch 5-HTP konnten in P815 Zellen nachgewiesen werden. In COS7 und HEK293 Zellen waren nur sehr geringe, vermutlich durch das Serum des Zellkulturmediums eingebrachte 5-HT-Mengen (Abb. 55a) und praktisch kein 5-HTP nachweisbar (Abb. 55b). Durch den hohen 5-HT-Gehalt der P815 Zellen bei gleichzeitig hohen 5-HTP-Werten konnte indirekt die für den Assay unerlässliche AAAD Aktivität der Zellen demonstriert werden.



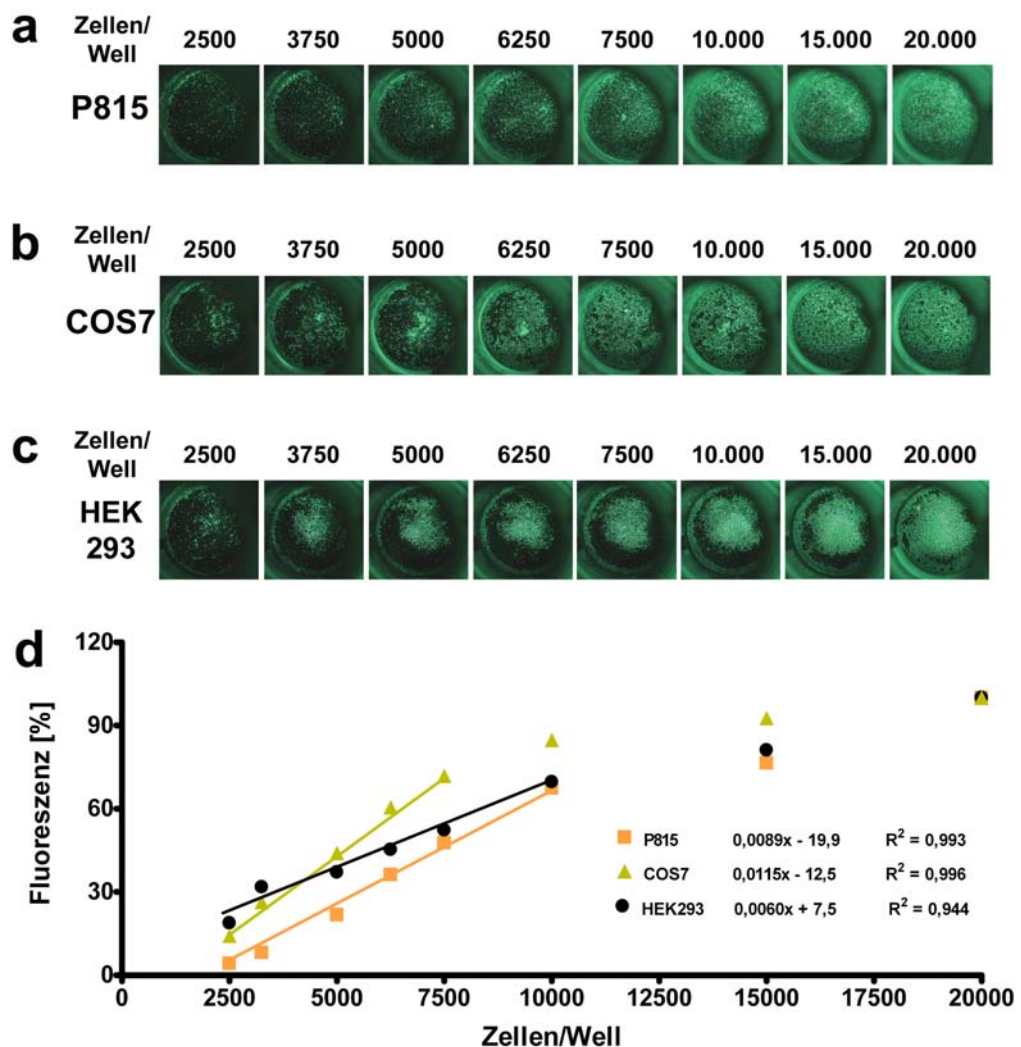
**Abb. 55: 5-HT (a) und 5-HTP (b) in COS7, HEK293 und P815 Zellen.** Die jeweiligen Zellen wurden gezählt, lysiert und mit der HPLC vermessen. n = 6.

Aufgrund der aus RPA, Westernblott und HPLC-Messung gewonnenen Daten wurden die P815 Zellen mit ihrer starken TPH1-Expression als Zelllinie für den Assay ausgewählt. Als

Kontrollzellen ohne jegliche TPH-Expression wurden die Zelllinien HEK293 und COS7 gewählt. Die TT Zellen konnten nicht als Modell für eine TPH2-Zelllinie genutzt werden, da die TPH2-Expression extrem gering und die Wachstumsrate der Zellen sehr niedrig war.

### 3.4.2 Testung des fluorometrischen Messprinzips

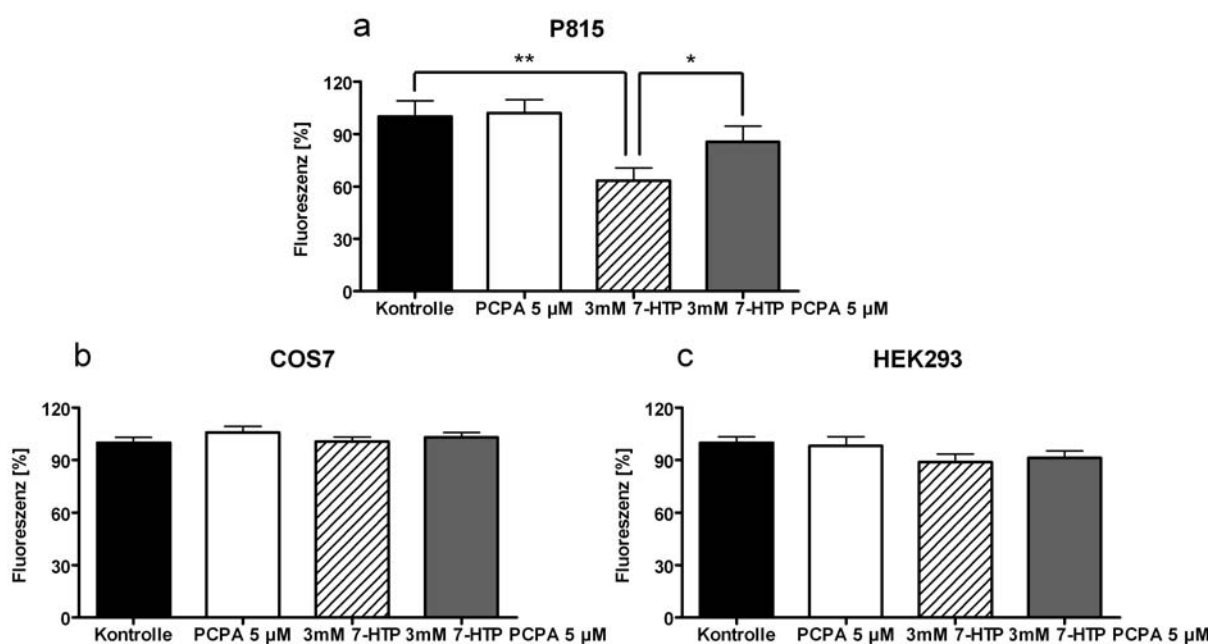
Nun sollte getestet werden, ob für das fluorometrische Messverfahren Calcein-AM als Marker für vitale Zellen geeignet war. Hierzu wurden Zellen der 3 ausgewählten Zelllinien P815, COS7 und HEK293 in verschiedene Zelldichten in 96-Well-Platten eingesät, mit Calcein-AM inkubiert und im 96-Well-Fluoreszenzplattenleser vermessen. Es stellte sich heraus, dass die im Zelldichtenbereich von 2500 bis 10.000 Zellen/Well ein stark linearer Zusammenhang zwischen Zellanzahl und gemessener Fluoreszenz besteht (Abb. 56) und das Verfahren folglich in diesem Dichtebereich für den Assay geeignet ist.



**Abb. 56: Zusammenhang zwischen Zellzahl und gemessenem Fluoreszenzsignal bei P815, COS7 und HEK293 Zellen.** Die jeweiligen Zellen wurden mit den angegebenen Zellzahlen in 96-Well-Platten eingesät und 40 h später für 30 min mit Calcein-AM inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz/Well bei 490/515 nm gemessen (d). Zur Kontrolle wurden die Platten unter dem Binokular betrachtet (a-c). n = 12.

### 3.4.3 TPH-Aktivitätsassay mit dem TPH-Inhibitor PCPA und 7-HTP

Zunächst wurde die Verträglichkeit des TPH-Inhibitors PCPA bei den Zelllinien COS7, HEK293 und P815 Zellen getestet. Im Bereich von 2,5 bis 250  $\mu\text{M}$  PCPA konnte kein signifikanter Effekt auf die Vitalität der Zellen festgestellt werden. Danach wurde getestet, bei welcher Konzentration 7-HTP seine toxische Wirkung auf welche Dichte von TPH-exprimierende Zellen entfaltet. Dabei wurde ermittelt, dass bei Werten ab 3 mM 7-HTP ein Großteil der P815 Zellen, die mit 5000 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte eingesät worden waren, innerhalb von 16 h abstarb. Die COS7 und HEK293 Zellen hingegen überlebten. Beim eigentlichen Test wurden die Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  PCPA, 3 mM 7-HTP und beiden Substanzen zusammen inkubiert. 7-HTP senkte die Anzahl der überlebenden P815 Zellen signifikant auf 60 % des Niveaus der unbehandelten Zellen. Die Anwesenheit von PCPA im 7-HTP Ansatz hob die P815 Zellanzahl signifikant auf ca. 80 % der Kontrolle an. Die COS7 und HEK293 Zellen reagierten auf keine der Substanzen mit einer signifikanten Änderung der Anzahl lebender Zellen (Abb. 57).



**Abb. 57: P815 (a), COS7 (b) und HEK293 (c) Zellen mit 7-HTP und PCPA.** Die Zellen wurden zusammen mit 5  $\mu\text{M}$  PCPA mit einer Dichte von 5000 Zellen/Well in 96-Well-Platten eingesät. 24 h später wurde frisches PCPA und 3 mM 7-HTP hinzugegeben. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen mit Calcein-AM behandelt und nach 30 min Inkubationszeit fluorometrisch vermessen. n = 24; \*: p > 0,05; \*\*: p > 0,01.

Es stellte sich heraus, dass der Assay sehr anfällig auf geringe Variationen der anfänglichen Zellzahl und der Stimulationszeitpunkte reagierte. Als Reaktion darauf kam es vor, dass die P815 Zellen trotz gleich bleibender 7-HTP Konzentration nicht abstarben bzw. ein Rescue mit PCPA aufgrund eines massiven Zellsterbens nicht möglich war.



### 3.5 Y2H-Screening nach TPH2-Interaktionspartnern

#### 3.5.1 Domänenunterteilung der TPH2 für das Y2H-Screening

Für einen Y2H-Screening wurde die TPH2 in 4 Domänen unterteilt. Sie wurde dann sowohl als full-length Enzym, sowie in Form einzelner und kombinierter Domänen (Abb. 58) in die Vektoren pGAD426 und pBTM117c inseriert und beim Screeningverfahren eingesetzt.

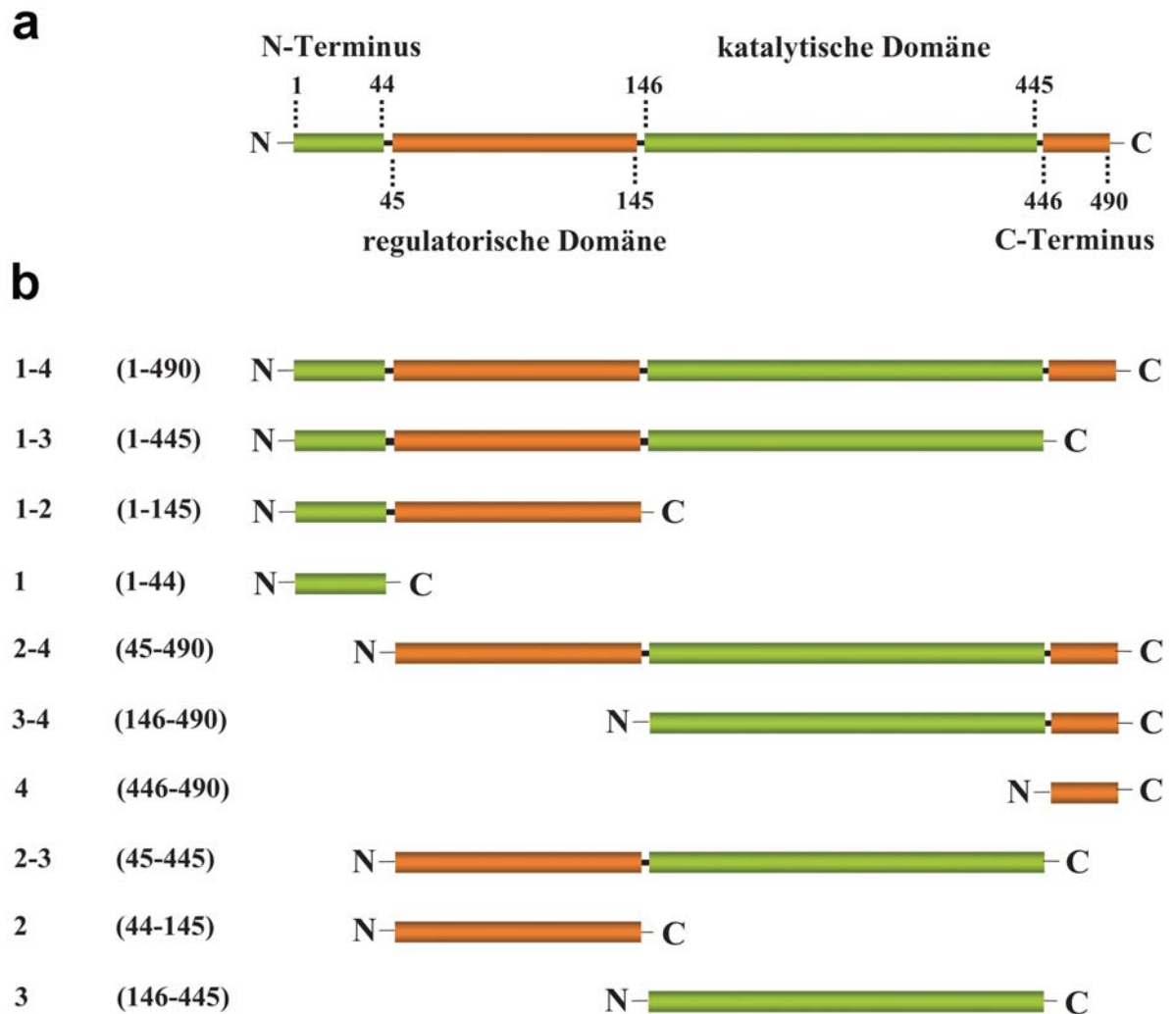
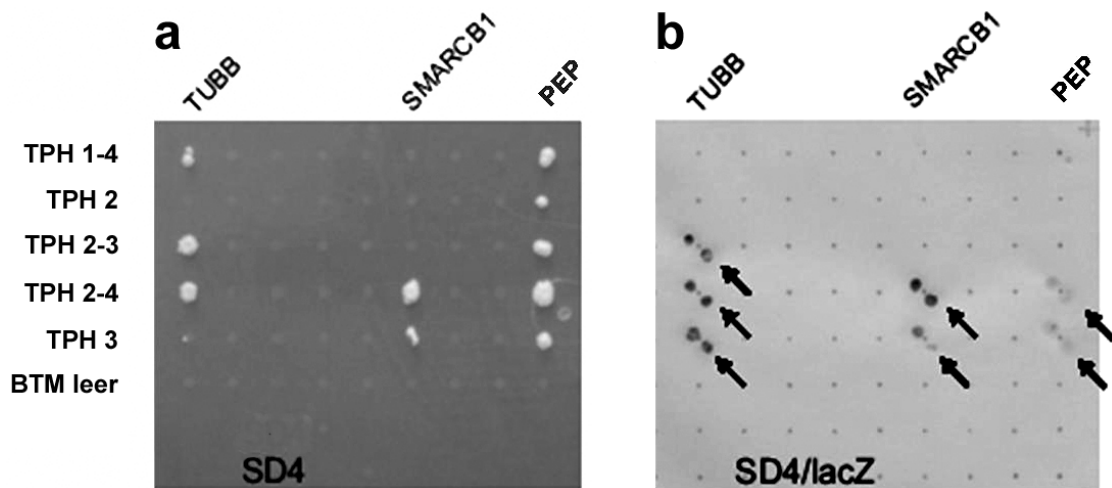


Abb. 58: Domänenunterteilung der hTPH2 für die Konstrukte des Y2H-Screenings.

#### 3.5.2 Resultate des Y2H-Screenings

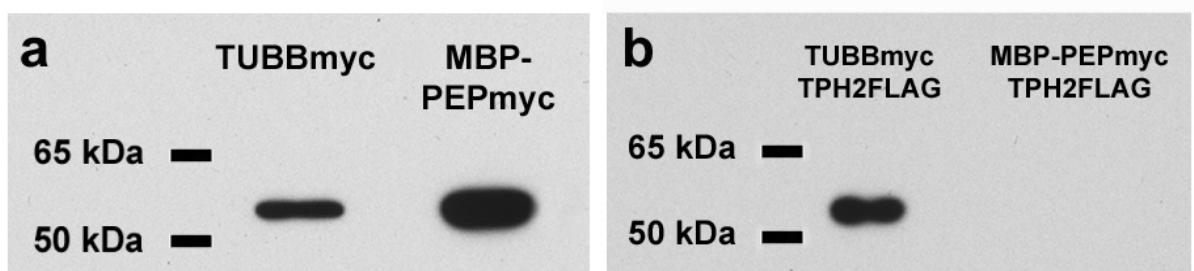
Im Y2H-Screening konnten drei mögliche Interaktionspartner der hTPH2 identifiziert werden: PEP-19 (Purkinje cell protein 4; PCP4), SMARCB1 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1) und TUBB (Tubulin $\beta$ 2A) (Abb. 59).



**Abb. 59: Wachstumstest (a) und  $\beta$ -Galaktosidasetest (b) beim Interaktionsmating.** Die bei einem initialen Wachstumstest auf SD2 (-Trp-Leu) Agarplatten als diploide, die Bait- und Preyvektoren tragende Klone identifizierten Hefeklone wurden auf SD4 (-Trp-Leu-His-Ura) Selektionsagarplatten (a) umgesetzt, um die Klone mit einer positiven Bait-Prey Interaktion zu identifizieren. Diese positiven Klone wurden als Duplikate auf eine Nylonmembran auf SD4 Selektionsplatten übertragen und die positive Interaktion durch den Nachweis von  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestätigt (b).

### 3.5.3 Überprüfung der möglichen TPH2-Interaktionspartner durch Koimmunopräzipitation

Die cDNAs der 3 möglichen Interaktionspartner wurden mit einem C-terminalen myc-Epitop versehen und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Die Expression erfolgte in COS7 Zellen. SMARCB1 und PEP konnten bedauerlicherweise nicht auf einem nachweisbaren Level exprimiert werden. Deswegen wurde PEP durch eine Insertion in den pMAL-c2X Vektor mit dem maltosebindenden Protein (MBP) gekoppelt und in Bakterien überexprimiert. Letztendlich gelang es, TUBBmyc und MBP-PEPmyc erfolgreich zu exprimieren (Abb. 60a).

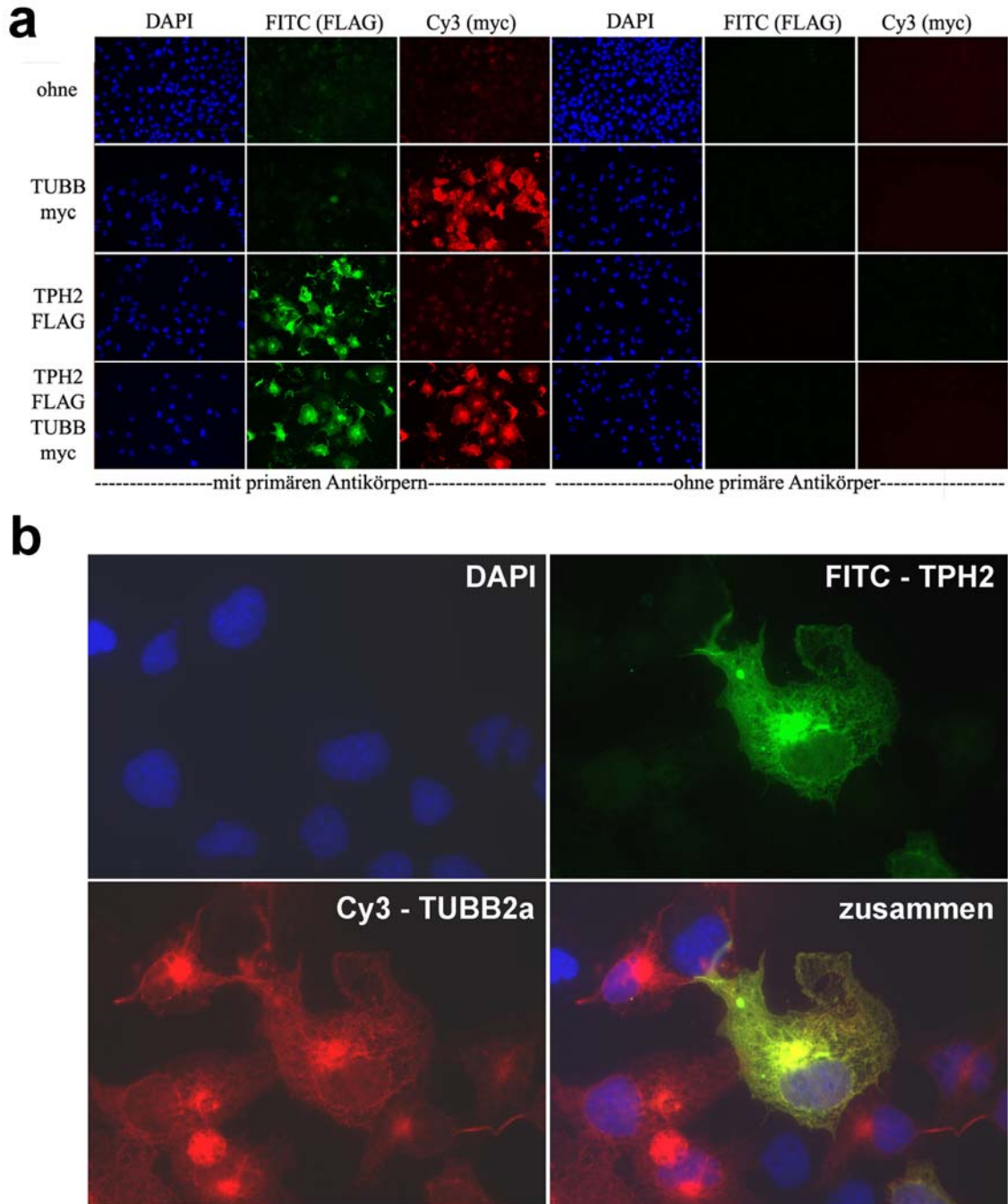


**Abb. 60: Expressionsnachweis (a) und Koimmunopräzipitation (b) der möglichen TPH2-Interaktionspartner.** (a) Nachweis der erfolgreichen Expression von hTUBBmyc und MBP-hPEPmyc im Lysat transfizierter COS7 Zellen bzw. im Bakterienlysat mittels anti-myc-Antikörper. (b) Nachweis der Interaktion von hTUBBmyc und hTPH2FLAG mittels Koimmunopräzipitation von hTUBBmyc und hTPH2FLAG mit agarosebeadgekoppelten anti-myc-Antikörpern und anschließendem Westernblottnachweis von hTPH2FLAG mit einem anti-FLAG-Antikörper.

Mit Hilfe von TUBBmyc konnte TPH2FLAG in einem Koimmunopräzipitationsexperiment erfolgreich präzipitiert werden (Abb. 60b). Mit MBP-PEPmyc gelang dies nicht.

### 3.5.4 Kolokalisation von TPH2 und TUBB

Um die Ergebnisse der Koimmunopräzipitation zu bestätigen, wurde die Kolokalisation von TPH2FLAG und TUBBmyc in kotransfizierten COS7 Zellen gezeigt (Abb. 61).



**Abb. 61: Kolokalisation von hTPH2FLAG und hTUBBmyc in kotransfizierten COS7 Zellen.** (a) Untransfizierte bzw. mit TUBBFLAG, TPH2myc oder TUBBFLAG und TPH2myc transfizierte COS7 Zellen wurden in Chamber Slides ausgesät und mit anti-myc- und anti-FLAG-Antikörpern inkubiert. (b) Mit TUBBFLAG und TPH2myc kotransfizierte und mit anti-myc- und anti-FLAG-Antikörpern inkubierte COS7 Zellen.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Expression der TPH**

#### **4.1.1 Expressionsmuster der TPH-Isozyme in Ratte und Maus**

Die Expression der TPH2-mRNA konnte in Hirn und Hoden von Ratten und Mäusen nachgewiesen werden. Damit konnte zum einen der bereits bekannte TPH2-Expressionsort Gehirn (Walther et al., 03a) bestätigt werden. Zum anderen wurde der Hoden als ein weiteres, bis dahin unbekanntes TPH2-exprimierendes Gewebe identifiziert.

#### **4.1.2 TPH im Hoden**

Der Nachweis von TPH2-mRNA im Hoden von Mäusen und Ratten ergänzt eine frühere Studie, die zu einer Zeit durchgeführt wurden, als die TPH2 noch unbekannt war, welche die Anwesenheit eines TPH-Proteins in den Leydigzellen demonstriert (Frungieri et al., 02). Bei der genauer Untersuchung der Hoden von TPH1<sup>-/-</sup> und TPH1<sup>+/+</sup> Tieren konnte im Hoden der TPH1<sup>-/-</sup> Tiere kein 5-HT detektiert werden, die Hoden der TPH1<sup>+/+</sup> Tiere hingegen hatten einen hohen 5-HT-Gehalt. Als Ursache für die Unterschiede im 5-HT-Gehalt ist zu benennen, dass das bei den TPH<sup>+/+</sup> Tieren nachgewiesene 5-HT höchstwahrscheinlich aus dem Blut der Tiere stammt und somit seine ursprüngliche Quelle in den TPH1-exprimierenden, 5-HT-produzierenden enterochromaffinen Zellen der Darmwand hat. Da die TPH1<sup>-/-</sup> keine nachweisbaren 5-HT-Mengen mehr im Blut haben (Walther et al., 03a), kann es auch folglich nicht zum Hoden transportiert werden. Sowohl die Hoden der TPH1<sup>-/-</sup> als auch der TPH<sup>+/+</sup> Tiere enthielten allerdings die gleichen, hohen 5-HTP-Mengen. Dies deutet darauf hin, dass dieses 5-HTP ausschließlich auf die hodeneigene Aktivität der TPH2 zurückzuführen ist. Das 5-HTP befand sich in den Leydigzellen des Hodens. Im Hoden konnten keine nennenswerte Aktivität der 5-HTP zu 5-HT umwandelnden AAAD detektiert werden, was die hohen 5-HTP-Level bei gleichzeitigem Fehlen von 5-HT in den TPH<sup>-/-</sup> Tieren erklärt und nochmals das Blut als einzige 5-HT-Quelle des Hodens auszeichnet.

In früheren Studien wurde 5-HT durch Immunolokalisation in den Mast- (Aguilar et al., 95; Frungieri et al., 99) und Leydigzellen (Frungieri et al., 99) des Ratten- und Hamsterhodens nachgewiesen. Da ein Großteil der kommerziell erwerblichen 5-HT-Antikörper aber generell eine hohe Crossreaktivität mit 5-HT-Derivaten wie 5-HTP oder Melatonin zeigt (Levin, 04), ist es denkbar und aufgrund der nun gewonnenen Daten auch wahrscheinlich, dass in diesen Arbeiten gar nicht 5-HT sondern lediglich 5-HTP detektiert wurde.

Die Identifizierung des Hodens als zweites TPH-expimierendes Gewebe außerhalb des ZNS macht eine Klärung der Funktion der TPH2 an diesem Expressionsort natürlich unumgänglich. Gerade in Betracht der selektiven Beeinflussung des ZNS durch TPH2-aktivitätsmodulierende Substanzen wären ungewollte Begleiterscheinungen im Hoden alles andere als erwünschenswert. Da der Hoden allerdings über keine AAAD Aktivität verfügt, die 5-HTP weiter zu 5-HT metabolisiert und auch kein 5-HT im Hoden der fertilen TPH1-/- Mäusen nachgewiesen werden konnte, scheint der TPH2-Expression in diesem Gewebe keine entscheidende Bedeutung zuzukommen, und eine pharmakologische Veränderung der TPH2-Aktivität würde auch ohnehin keine Effekte über 5-HT-Veränderungen auslösen können und könnte deswegen vernachlässigt werden.

#### 4.1.3 Alternatives Splicing der TPH2 in Rattenhirn und -hoden

In mehr als 99 % aller Fälle besteht eine Splice Stelle aus der Splicedonorsequenz GT am 5'-Ende und der Spliceakzeptorsequenz AG am 3'-Ende der Intronsequenz (Breathnach et al., 78; Breathnach und Chambon, 81). Es wurde aber auch eine Anzahl anderer, ungewöhnlicher Splice Stellen mit GC-AG, GG-AG, GT-TG, GT-CG oder CT-AG Dinukleotiden an den Intron Grenzen beobachtet (Hodge und Cumsy, 89; Jackson, 91; Shapiro und Senapathy, 87; Wieringa et al., 83; Xue und Rask, 95). AT-AC Splice paare bilden eine weitere Alternative zum normalen GT-AG Splicen (Jackson, 91; Kohrman et al., 96; Yu und Steitz, 97; Wu und Krainer, 98; Wu und Krainer, 97; Wu und Krainer, 96; Kolossova und Padgett, 97; Hall und Padgett, 94; Hall und Padgett, 96; Feng et al., 97). Burset *et al.* (Burge et al., 98) konnte eine statistische Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Splice Stellen in Säugern erstellen. Danach treten an den Intron Grenzen zu 99,24 % GT-AG, zu 0,69 % GC-AG, zu 0,05 % AT-AC und zu 0,02 % alle anderen zuvor genannten ungewöhnlichen Dinukleotidpaare auf. Die in der Ratte bisher nachgewiesene und in den Datenbanken verzeichnete Proteinform der TPH2 basiert auf einem Splice ereignis, welches eine GC-AG Stelle nutzt. Diese gehört sie zu den ungewöhnlichen Splice Stellen, die nur bei ca. 0,69 % aller Splice ereignisse in Säugerzellen genutzt werden. Auf dem mRNA-Level konnten jedoch in Proben von Hirn und Hoden 3 weitere Splice varianten der rTPH2 nachgewiesen werden, von denen eine ebenfalls eine (alternative) GC-AG Stelle nutzt. Den anderen beiden mRNAs liegt ein GT-AG Splicing zugrunde, welches zu den mit 99,24 % häufigsten Splice varianten gehört. Durch die 4 verschiedenen Splicings entstehen theoretisch 4 verschiedene rTPH2-Proteine, die über einen Einschub von Isoleucin oder Glycin und Lysin oder Isoleucin, Glycin und Lysin zwischen den Aminosäure 145 und 146 der „normalen“ TPH2 verfügen. Die dominante, in allen Datenbasen verzeichnete Form ist aber die an der ungewöhnlichen Stelle GC-AG gespligte

rTPH2 ohne Einschub. Es ist denkbar, dass die Nutzung der ungewöhnlichen Splice Stelle durch einen Splice enhancer gefördert wird. Für die gewebsspezifische Regulation des mRNA Splicings durch exonische Splicing enhancer (Reed und Maniatis, 86) und intronische Elemente (Guo et al., 91; Gooding et al., 94; Black, 92; Huh und Hynes, 94; Ryan und Cooper, 96), welche die Erkennungseffizienz der einer Splice Stellen beeinflussen, gibt es eine große Anzahl von Beispielen. Diese beschriebenen alternativen Splicing events resultieren aber, anders als bei dem untersuchten alternativen rTPH2-Splicing, im Ausschluss von kompletten Exons.

Beim untersuchten TPH2-Splicing befindet sich die Insertionsstelle im TPH2 Protein unmittelbar vor der Grenze zur katalytischen Domäne innerhalb der regulatorischen Domäne der TPH2. In diesem direkt von der Insertion betroffenen Bereich liegen aber keine bis jetzt mit einer konkreten Funktion in Verbindung gebrachten Sequenzen. Ein Einfluss der Insertion auf die Struktur und somit vielleicht auch die Aktivität des Enzyms ist dennoch nicht auszuschließen. Deswegen ist es notwendig, die Auswirkungen der 3 unterschiedlichen Aminosäureinsertionen auf die katalytische Aktivität der jeweiligen TPH2-Isoformen in Zukunft genauer zu untersuchen, und den Anteil der 4 möglicherweise unterschiedlich aktiven Isoformen an der insgesamt in den Geweben translatierten TPH2-Proteinmenge und die daraus resultierenden Veränderungen in der Gesamt-TPH-Aktivität genauer zu bestimmen. Erste, auf Grundlage von RT-PCRs erfolgte Abschätzungen deuten darauf hin, dass die Häufigkeitsverteilung der 4 Splicevarianten im Vergleich der TPH2-exprimierenden Rattengewebe Hirn und Hoden gleich ist. Darüber hinaus macht die Tatsache, dass im Menschen nur eine der alternativen Splice Stellen und in der Maus gar keine vorhanden ist, die physiologische Bedeutung des alternativen Splicings in der Ratte fragwürdig.

## **4.2 Biochemische Charakterisierung der TPH**

Durch die Identifizierung eines zweiten TPH-Isozyms, welches sich als das für die 5-HT-Synthesevorgänge im ZNS verantwortliche Enzym herausstellte, ist es nun theoretisch möglich, durch gezielte Einflussnahme auf die TPH2 die serotonergen Vorgänge im ZNS zu beeinflussen, ohne gleichzeitig Einfluss auf das TPH1-basierte serotonerge System der Peripherie zu nehmen. Um aber einen solchen gezielten Eingriff durchführen zu können, ist zunächst eine gründliche biochemische Charakterisierung der TPH2 zum Auffinden von Unterschieden zur TPH1 nötig.

#### 4.2.1 Kinetische Charakterisierung von TPH1 und 2

Unsere Beobachtung, dass die hTPH1 einen wesentlich niedrigeren  $K_m$  als die hTPH2 besitzt bestätigt im Wesentlichen Ergebnisse von McKinney *et al.* (McKinney *et al.*, 05), der für die bakteriell exprimierten, aufgereinigten und von ihren Epitopen abgespaltenen hTPH1- und hTPH2-Enzyme  $K_m$ -Werte von 22.8  $\mu\text{M}$  und 40.3  $\mu\text{M}$  (250  $\mu\text{M}$  BH4) angibt. In unseren Experimenten erhielten wir einen  $K_m$ -Wert von 15  $\mu\text{M}$  für die hTPH1 und einen im Vergleich zu McKinneys Wert etwas erhöhten  $K_m$  von 77  $\mu\text{M}$  für die hTPH2.

In der Literatur ist generell eine starke Variabilität der  $K_m$ -Werte für die TPH1 und 2 zu verzeichnen. Nakamura (Nakamura *et al.*, 06) exprimierte TPH-V5-HIS Fusionsproteine in COS7 Zellen und fand  $K_m$ -Werte von 16.6  $\mu\text{M}$  für hTPH1 und 19.2  $\mu\text{M}$  für hTPH2 (400  $\mu\text{M}$  BH4). Friedman (Friedman *et al.*, 72) maß für bakteriell exprimierte hTPH1  $K_m$ -Werte von 8  $\mu\text{M}$  (250  $\mu\text{M}$  BH4) und 7  $\mu\text{M}$  (125  $\mu\text{M}$  6MPH4). Eine aufgereinigte TPH (nach heutigem Wissensstand höchstwahrscheinlich TPH2) aus der dorsalen Raphe hatte einen  $K_m$  von 142  $\mu\text{M}$  (125  $\mu\text{M}$  6MPH4 (Yamaguchi *et al.*, 81)). Diese Variabilität in der Literatur ist nicht nur in Bezug auf humane TPH-Enzyme zu finden, sondern auch bei anderen Spezies wie Ratte und Maus. Eine aufgereinigte TPH vom Hirnstamm (vermutlich TPH2) hatten einen  $K_m$  von 125  $\mu\text{M}$  (400  $\mu\text{M}$  6MPH4 (Nakata und Fujisawa, 82a)) und in einer anderen Studie einen  $K_m$  von 236  $\mu\text{M}$  (320  $\mu\text{M}$  6MPH4 (Hamon *et al.*, 81)). Für bakteriell exprimierte mTPH1 und mTPH1 aus der murinen Mastocytoma Zelllinie P815 wurden  $K_m$ -Werte von 35.5  $\mu\text{M}$  (75  $\mu\text{M}$  6MPH4 (Park *et al.*, 94)) und 45  $\mu\text{M}$  (200  $\mu\text{M}$  6MPH4 (Nakata und Fujisawa, 82b)) detektiert. Eine rekombinant in Bakterien generierte mTPH2 hatte einen  $K_m$  von 71.2  $\mu\text{M}$  (200  $\mu\text{M}$  BH4 (Sakowski *et al.*, 06b)).

Die beobachteten Unterschiede können durch eine Vielzahl von zwischen den einzelnen Studien variierenden Faktoren wie dem Expressionssystem, dem Fusionszustand der TPH, der Aufreinigungsmethode und den Assaybedingungen erklärt werden. Gerade bei der Durchführung des TPH-Aktivitätsassays sind gravierende Unterschiede bei der Wahl der Inkubationszeiten, Substanzen und deren Konzentrationen, wie z.B. bei den Kofaktoren (BH4 oder 6MPH4), zu verzeichnen. Bei unseren Experimenten benutzten wir unaufgereinigte Lysate von mit TPH transfizierten COS7 Zellen, welchen in Bezug auf das Vorhandensein von möglichen Interaktionspartnern, phosphorylierenden Enzymen usw. viel physiologischere Bedingungen liefern als Assays, welche mit bakteriell oder *in vitro* exprimierten TPH-Enzymen durchgeführt werden.

Betrachtet man die  $K_m$ -Werte von TPH1 und 2 (15 und 77  $\mu\text{M}$ ) in Bezug auf die im Mausehirn gemessene mittlere Trp-Konzentration von 16  $\mu\text{M}$ , dann wird deutlich, wie sehr die Substratverfügbarkeit die Aktivität der beiden Enzyme, beeinflussen kann. Die TPH1 ist nämlich unter den angegebenen Voraussetzungen nur zu etwa 50 % gesättigt, die TPH2 zu weniger als 20 %. Kleine Veränderungen im Trp-Gehalt hätten also große Veränderungen in der Enzymaktivität zur Folge. Da die Synthese von 5-HTP aus Trp der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der 5-HT-Synthese ist, würde eine erhöhte Trp-Verfügbarkeit folglich auch in einer erhöhten 5-HT-Synthese resultieren. Tierstudien haben in der Tat gezeigt, dass 5-HT-Synthese und -gehalt im Rattenhirn in der Tat parallel zur Trp-Konzentration variieren (Fernstrom, 83). Außerdem wurde demonstriert, dass ein Anstieg in der Trp-Konzentration im Hirn die 5-HT-Ausschüttung *in vitro* (Auerbach und Lipton, 85; Schaechter und Wurtman, 89) und *in vivo* (Carboni et al., 89; Sharp et al., 92) steigert. Es gibt aber auch Studien, die diesen Aussagen widersprechen (Elks et al., 79; Marsden et al., 79).

Da TPH1 und 2 hochgradig homolog sind, in Bezug auf die an der Katalyse und Phosphorylierung beteiligten Aminosäurepositionen keinerlei Unterschiede aufweisen und lediglich in den Sequenzen ihrer N- und C-Termini differieren, liegt die Vermutung nahe, dass diese beiden Enzymteile für die beobachteten Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Isozymen verantwortlich sind.

#### 4.2.2 Bedeutung des C-Terminus für die TPH2-Aktivität

Es konnte gezeigt werden, dass die hTPH2 *in vitro* die Fähigkeit zur Homooligomerbildung besitzt. Diese Ergebnisse unterstützen Daten von Nakata und Fujisawa (Nakata und Fujisawa, 82a), die für ihre Untersuchungen aufgereinigte TPH vom Kaninchenhirnstamm verwendeten. Aufgrund des heute bekannten Expressionsmusters der TPH2 im Hirn kann davon ausgegangen werden, dass sie das neuronale Isozym TPH2 und nicht TPH1 aufreinigten. Für die native TPH2 konnten sie eine Masse von 288-300 kDa nachweisen, was bei einer theoretischen Monomermasse von 56 kDa auf die Ausbildung von Tetrameren schließen lässt. McKinney *et al.* (McKinney et al., 05) fanden für eine *in vitro* transkribierte und translatierte hTPH2 vergleichbare Werte von 274 kDa. Neuste Studien von Cakaci-Salli *et al.* (Carkaci-Salli et al., 06) mit bakteriell exprimierter hTPH2 konnten zeigen, dass die full-length TPH2 Tetramere mit einer Masse von 236 kDa bildet.

Darüber hinaus wurde entdeckt, dass hTPH1 und 2 nicht nur dazu in der Lage sind, Homooligomere miteinander auszubilden, sondern dass auch eine Heterooligomerbildung mit der gleichen Affinität möglich ist. Es ist aber fraglich, ob diesen Heterooligomeren *in vivo*



irgendeine physiologische Bedeutung zukommt, da sich die Expressionsmuster der beiden Isozyme komplett voneinander unterscheiden. Die TPH1 wird vornehmlich im Darm und in der Epiphyse exprimiert, wohingegen die TPH2-Expression hauptsächlich im Hirnstamm (Walther et al., 03a) aber auch im Hoden stattfindet. Leucine und andere hydrophobe Aminosäuren sind innerhalb des C-terminalen Endes der TPH1 und 2 hoch konserviert. Da es auch diese Aminosäuren sind, die das für die Oligomerisierung verantwortliche Leucin Zipper Motiv bilden, ist es nicht weiter überraschend, dass die beiden Isozyme zu einer gegenseitigen Interaktion in der Lage sind.

Unter Einsatz von Deletionmutanten konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von 51 Aminosäuren vom C-Terminus der hTPH2 die Bildung von Oligomeren verhindert und die enzymatische Aktivität so gut wie komplett aufzuheben vermag. Auch die Deletion von 17 und 19 C-terminalen Aminosäuren verhindert die Oligomerisierung, ist also folglich ausreichend, um die Funktion des Leucin Zippers als Tetramerisierungsdomäne zu zerstören, reduziert die  $V_{\max}$  aber nur um 50 %. Diese Ergebnisse werden durch Experimente mit einer bakteriell exprimierten TPH2-Doppeldeletionsmutante (NΔ150/CΔ24) unterstützt, die nur in Form eines 39 kDA großen Monomers existierte, wohingegen die NΔ150 Mutante als Tetramer vorlag (Carkaci-Salli et al., 06). Die gewonnenen Erkenntnisse sind auch mit an TPH1 durchgeführten Studien vergleichbar. In der Kaninchen-TPH1 zerstörte eine Deletion der letzten 49 Aminosäuren die enzymatische Aktivität vollständig, wohingegen die Deletion von 17 Aminosäuren keinen Effekt auf die TPH-Aktivität hatte (Mockus et al., 97). In einer anderen Studie führte eine Deletion von 19 Aminosäuren vom C-Terminus der hTPH1 zu einem Enzym, das nur noch 1/11 der Aktivität des full-length Enzyms besaß, und eine Deletion von 55 Aminosäuren resultierte in einem kompletten Aktivitätsverlust (Yang und Kaufman, 94). Für die Tyrosinhydroxylase, ein anderes Mitglied der Familie der AAAHs, wurde eine 70 %ige Aktivitätsreduzierung bei einer ΔC19 Mutante und ein vollständiger Aktivitätsverlust bei einer ΔC50 Mutante beschrieben (Walker et al., 94).

Es gibt zwei Veröffentlichungen, die aktivitätsreduzierende SNPs im C-terminalen Teil der TPH2 beschreiben. Zhang *et al.* (Zhang et al., 05) berichtet von einem funktionellen SNP (G1463A) in der kodierenden Sequenz der hTPH2, der in einem Austausch des hochkonservierten Arginins 441 durch Histidin resultiert. Dieser Austausch führte in transfizierten PC12 Zellen zu einer ~ 80 %igen Reduktion der 5-HT-Produktion. Außerdem wird in dieser Publikation gezeigt, dass das TPH2<sub>1463G</sub>-Allel in einer Gruppe von 87 Depressionspatienten signifikant häufiger auftrat als eine Gruppe von 219 Kontrollpersonen. Es existiert eine große Anzahl von Reaktionen auf den klinischen Teil dieser Veröffentlichung.

Zusammengenommen wurden über 5000 Proben von depressiven Patienten und Kontrollpersonen aus verschiedenen ethnischen Gruppen hinsichtlich des von Zhang *et al.* (Zhang et al., 05) beschriebenen SNP<sub>G1463A</sub> untersucht (Blakely, 05; Zhou et al., 05; Glatt et al., 05; Van Den et al., 05; Bicalho et al., 06; Delorme et al., 06; Garriock et al., 05). Aber das TPH2<sub>1463G</sub>-Allel konnte bei keinem der Probanden nachgewiesen werden.

Ein anderer funktioneller SNP (C1473G) in der kodierenden Sequenz der TPH2 wurde in Mäusen gefunden (Zhang et al., 04). Dieser SNP führt zu einem Austausch des hochkonservierten Prolin 447 durch Arginin. Diese Mutation resultiert in einer ~ 55 %igen Senkung der 5-HT-Level in mTPH<sub>447R</sub> exprimierenden PC12 Zellen im Vergleich zu mTPH<sub>447P</sub> exprimierenden Zellen. In dieser Publikation wurde darüber hinaus gezeigt, dass in BALB/c und DBA/2 Mäusen, die homozygot für das mTPH<sub>1473G</sub>-Allel sind, der 5-HT-Gehalt und die 5-HT-Synthese in verschiedenen Hirnregionen im Vergleich zu für das mTPH<sub>1473C</sub>-Allel homozygoten C57BL/6 und 129X1/SvJ Mäusen reduziert sind. Weiterhin zitieren Zhang *et al.* (Zhang et al., 04) Studien, die 5-HT-bedingte Verhaltensunterschiede zwischen den beiden „Arten“ von Mäusen feststellten (Lucki et al., 01).

Beide beschriebenen SNPs befinden sich im C-terminalen Ende der TPH2, knapp innerhalb des deletierten Teils der TPH2 $\Delta$ C51 Mutante (Abb. 62), die durch einen kompletten Ausfall der enzymatischen Aktivität gekennzeichnet ist. Obwohl ihre klinische Relevanz fragwürdig ist, unterstützen die die hTPH2<sub>R441H</sub>- und mTPH2<sub>P447R</sub>-Mutanten betreffenden funktionellen Daten, welche aus beiden Studien (Zhang et al., 04; Zhang et al., 05) gewonnen wurden, die große Bedeutung des C-Terminus (zusätzlich zu seiner Funktion als Oligomerisierungsdomäne) für die enzymatische Aktivität der TPH2.

hTPH2 434 DFAKSI **TR**PFSVYFNPYTQSI~~ELKD~~TRSIENVVQDLR **SD** **LNTVCDAL**NKMNQYLGI 490  
mTPH2 432 DFAKSI **TR**PFSVYFNPYTQSI~~ELKD~~TRSIENVVQDLR **SD** **LNTVCDAL**NKMNQYLGI 488

**Abb. 62: Aminosäuresequenz des C-Terminus der TPH2.** rot: Positionen des R441H Polymorphismus in hTPH2 und des P447R Polymorphismus in mTPH2; gelb: Endpunkt der Deletionsmutanten TPH2 $\Delta$ C51,  $\Delta$ C19 und  $\Delta$ C17; grün: an der Oligomerisierung beteiligte Aminosäuren.

Der Versuch, die Oligomerisierung durch die Zugabe eines C-terminalen Peptids, welches an die TPH2-C-Termini bindet und dabei die Bindung anderer TPH2-Untereinheiten blockiert, zu verhindern und somit auch Einfluss auf die Aktivität der TPH2 zu nehmen, war nur teilweise erfolgreich. Es konnte zwar ein leicht aktivitätssenkender Einfluss des C-terminalen Peptids gezeigt werden, die Oligomerisierung blieb aber unbeeinflusst. Bei der Aktivitätsstudie zeigte allerdings die kürzeste Inkubationszeit von TPH2 mit C-terminalem Peptid von nur 10 min den stärksten inhibierenden Einfluss. Bei längeren Inkubationszeiten nahm die TPH2-Aktivität wieder zu. Das Immunopräzipitationsexperiment fand hingegen

über einen Zeitraum von 4 h statt und zeigte keinerlei oligomerisierungsbeeinflussenden Effekt. Es ist also durchaus möglich, dass das C-terminale Peptid in dem verwendeten, ungereinigten Zelllysate einem massiven proteolytischen Abbauprozess unterlag und dieser Abbau innerhalb von 10 min natürlich wesentlich weniger Peptid vernichten könnte als innerhalb von 4 h. Deswegen konnte möglicherweise ein Effekt auf die Aktivität verzeichnet werden, wohingegen die Oligomerisierung aufgrund des massiven Abbaus des Peptids während einer so großen Zeitspanne unbeeinflusst blieb.

Der C-Terminus erfüllt also genau wie auch bei der TPH1 die Funktion einer Oligomerisierungsdomäne wobei die letzten 17 Aminosäuren für eine erfolgreiche Oligomerisierung unerlässlich und auch für die Aktivität des Enzyms von Bedeutung sind. Die nicht an der Oligomerisierung beteiligten C-terminalen Aminosäuren 439 bis 469 sind von entscheidender aber bis jetzt ungeklärter Bedeutung für die Aktivität der TPH2. Da sich in dem beschriebenen Bereich keine an der katalytischen Funktion beteiligten Bindungsstellen für Trp, BH<sub>4</sub> oder Fe<sup>2+</sup> befinden, lässt sich aber vermuten, dass er über intramolekulare Wechselwirkungen Einfluss auf die Struktur der TPH2 nehmen und somit eine Konformation des Enzyms ermöglichen kann, die für die Aktivität unerlässlich ist.

Die unterschiedlichen Deletionen vom C-terminalen Ende der TPH2 hatten ähnliche Auswirkungen wie in der Literatur für die TPH1 beschrieben. Der C-Terminus scheint also trotz seiner Sequenzunterschiede zur TPH1 nicht für die unterschiedlichen kinetischen Parameter der Isozyme TPH1 und 2 verantwortlich zu sein.

#### 4.2.3 Bedeutung des N-Terminus für die TPH2-Aktivität

TPH1 und 2 weisen, wie bereits vorher beschrieben, deutlich unterschiedliche  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte auf, wobei die hTPH1 mit 15  $\mu$ M Trp einen etwa 5-mal geringeren  $K_m$ -Wert als die hTPH2 mit 77  $\mu$ M besitzt. Der  $V_{max}$ -Wert von bakteriell exprimierter hTPH1 erreicht 650 nmol/min/mg und übersteigt den der hTPH2 von 200 nmol/min/mg (250  $\mu$ M BH<sub>4</sub>) damit um mehr als das 3-fache (McKinney et al., 05). Die TPH1 ist also das wesentlich aktivere der beiden Enzyme, obwohl beide Isozyme hochgradig homolog sind und in Bezug auf die an der Katalyse und Phosphorylierung beteiligten Aminosäurepositionen keinerlei Unterschiede aufweisen. Der „zusätzliche“, 44 Aminosäuren lange N-Terminus der TPH2 stellt den hauptsächlichsten Unterschied zwischen TPH1 und 2 dar.

Die hTPH2 $\Delta$ N44-Mutante hat im Vergleich zum full-length TPH2 Enzym tatsächlich einen 3-4-mal höheren  $V_{max}$ -Werte. Es ist es folglich wahrscheinlich, dass die 44 N-terminalen

Aminosäuren einen inhibitorischen Effekt auf die enzymatische Aktivität der TPH2 ausüben und dadurch die TPH2 weniger aktiv als die TPH1 ist.

Aber weder die Fusion der N-terminalen 44 Aminosäuren der TPH2 mit der TPH1 (hTPH1-2), noch die Zugabe eines 44 Aminosäuren langen synthetischen Peptids zur TPH2 oder TPH2 $\Delta$ N44 während des TPH-Aktivitätsassays konnte irgendwelche detektierbaren Veränderungen in der TPH2-Aktivität hervorrufen. Diese Negativergebnisse könnten durch einen raschen proteolytischen Abbau des N-terminalen Peptides, wie er bereits für das C-terminale Peptid diskutiert wurde, oder dadurch bedingt sein, dass eine mögliche Sekundärstruktur des N-Terminus und seine korrekte Verbindung mit dem Rest des Enzyms von großer Wichtigkeit für die einwandfreie und inhibitorische Funktion sind und diese Voraussetzungen unter den gegebenen Umständen nicht gewährleistet waren. Vermutlich ist ein synthetisches Peptid oder eine in nicht korrekter Weise mit dem Enzym verbundene Sequenz (hTPH1-2) nicht dazu in der Lage, den nativen Effekt des N-Terminus auf die TPH-Aktivität nachzuahmen. Nichtsdestotrotz scheint der N-Terminus zu einem großen Teil für die bei den kinetischen Parametern auftauchenden Unterschiede zwischen TPH1 und TPH2 verantwortlich zu sein.

Eine andere mögliche Ursache für den beobachteten inhibitorischen Effekt ist eine Interaktion der 44 N-terminalen Aminosäuren mit einem anderen Protein, welches an den N-Terminus bindet, dadurch die Zugänglichkeit katalytischen Domäne blockiert und somit zu einer Inhibierung der TPH2-Aktivität führt. Eine Deletion des N-Terminus würde die Bindung eines solchen inhibitorischen Proteins und somit auch eine Inhibition verhindern.

Im Y2H-Screening konnten allerdings keine Interaktionspartner gefunden werden, deren Ziel das N-terminale Ende der TPH2 ist. Die drei durch das Screening als mögliche Interaktionspartner identifizierten Proteine SMARCB1, PEP-19 und Tubulin $\beta$ 2A zeigten allesamt Wechselwirkungen mit Teilen der regulatorischen bzw. katalytischen Domäne.

Die einfachste Erklärung für den inhibitorischen Effekt des N-Terminus ist aber eine direkte Interaktion des N-Terminus mit katalytisch aktiven oder in einer anderen Art und Weise für die Aktivität des Enzyms entscheidenden Sequenzen (z.B. Phosphorylierungsstellen), die zu einer Blockierung dieser Stellen und somit zu einer Minderung der TPH2-Aktivität führt. Die Möglichkeit, dass die inhibierende Wirkung des N-Terminus durch seinen Phosphorylierungszustand vermittelt wird, soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

Die Affinität der anti-TPH-Antikörper für die verschiedenen Deletions- und Kombinationsmutanten wurde getestet, indem FLAG und myc gelabelte Proteine der full-

length und Deletionsmutanten sowohl mit anti-FLAG bzw. anti-myc als auch anti-TPH-Antikörpern nachgewiesen und auf die Epitopsignale normiert wurden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

#### 4.2.4 Phosphorylierung der TPH2 durch PKA

Aufgrund der hochgradigen Homologie zwischen TPH1 und 2 lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den zu den Phosphorylierungsstellen Ser58 und Ser260 der TPH1 homologen Positionen Ser104 und Ser306 der TPH2 ebenfalls um potentielle Phosphorylierungsstellen handelt. Auch der TPH2-N-Terminus enthält 5, zwischen verschiedenen Spezies konservierte mögliche Phosphorylierungsstellen: Ser9, Ser10, Ser19, Ser22 und Thr35. Anhand der Alanin- und Glutamatmutanten all dieser möglichen TPH2-Phosphorylierungsstellen konnte gezeigt werden, dass eine auf diese Weise nachgeahmte Phosphorylierung allein keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der TPH2 hat. Es konnte allerdings in einem anderen Versuch nachgewiesen werden, dass TPH1 und TPH2 durch die PKA phosphorylierbar sind. Hierbei wurden nicht nur die full-length TPH1 und 2 Proteine, sondern alle Alaninmutanten der Positionen 9, 10, 19, 22, 35, 104 und 306 und die N-terminale Deletionsmutante  $\Delta$ N44 erfolgreich phosphoryliert. Allerdings fiel die Phosphorylierung der Alaninmutante 104 wesentlich geringer aus als die der anderen Proteine. Es ist also anzunehmen, dass neben der von McKinney *et al.* (McKinney et al., 05) identifizierten Phosphorylierungsstelle Ser19 mindestens eine zweite, durch die PKA phosphorylierbare Position außerhalb des TPH2-N-Terminus existiert, was von McKinney *et al.* (McKinney et al., 05) als nicht ausgeschlossen eingeräumt wird. Dabei könnten die Serine 104 bzw. 306, beide Serine oder auch gar nicht untersuchte Positionen Angriffsziele der PKA sein. Eine TPH2-Mutante mit deletiertem N-Terminus und Alaninsubstitutionen der Positionen Ser104 bzw. Ser306 könnte Aufschluss darüber geben, welche der beiden Positionen von der Phosphorylierung betroffen ist. Die Ser104 Mutante scheint aber durch ihre verminderte Phosphorylierbarkeit das Hauptziel der PKA zu sein. Da in der Literatur für die TPH1 bereits vielfach eine Phosphorylierung des Ser58 (= Ser104 der TPH2) durch die PKA nachgewiesen wurde (Kuhn et al., 97; Kumer et al., 97), wird es um so wahrscheinlicher, dass diese Position auch in der TPH2 ein bevorzugtes Phosphorylierungsziel der PKA ist.

In Übereinstimmung mit den Aktivitätsergebnissen der TPH2-Phosphomutanten gilt für die TPH1 die Annahme, dass eine Phosphorylierung allein keine nennenswerte Aktivitätssteigerung bewirkt, sondern lediglich die Bindung eines 14-3-3 Proteins an die am Ser58 phosphorylierte TPH1 ermöglicht, welche die Stabilität und Aktivität des Enzyms erhöht (Yamauchi et al., 81; Makita et al., 90; Banik et al., 97), wobei die Phosphorylierung

dieser Position hierbei durch die PKA (McKinney et al., 05; Kumer et al., 97; Kuhn et al., 97) oder die CaMKII (McKinney et al., 05; Jiang et al., 00) erfolgen kann. Dieses Modell ist allerdings umstritten, da viele ältere Studien eine ~ 2-fache Aktivitätserhöhung durch Phosphorylierung mittels PKA (Garber und Makman, 87; Johansen et al., 96) und CaMKII (Furukawa et al., 93; Hamon et al., 78; Kuhn et al., 78; Kuhn et al., 80c; Kuhn et al., 80b; Yamauchi und Fujisawa, 79b; Yamauchi und Fujisawa, 79a; Yamauchi et al., 81; Yamauchi und Fujisawa, 83) ohne 14-3-3 Zugabe zeigen konnten. Da für diese Studien aber aufgrund von Expressionsproblemen meist TPH-haltige Hirnhomogenate genutzt wurden, die selbstverständlich automatisch das etwas 1 % der gesamten Hirnproteinmenge ausmachende 14-3-3 Protein (Boston et al., 82) enthielten, ist natürlich eine Aktivierung der phosphorylierten TPH durch 14-3-3 in diesen Studien nicht auszuschließen. Für eine Beantwortung der Frage nach der Auswirkung einer Phosphorylierung auf die Aktivität der TPH2 wäre die Nutzung eines bakteriell exprimierten Proteins, welches mit rekombinantem 14-3-3 Protein und PKA bzw. CaMKII inkubiert werden würde, sicherlich der am besten geeignete Weg. McKinney *et al.* (McKinney et al., 05) phosphorylierten bakteriell exprimierte TPH2 mit PKA, inkubierten sie mit 14-3-3 Protein und waren zwar dazu in der Lage, die feste Bindung von 14-3-3 Protein an die phosphorylierte TPH2 nachzuweisen, konnten aber keine daraus resultierende Aktivitätsveränderung feststellen. Aufgrund dieser Daten und der Aktivitätsdaten der TPH2-Phosphomutanten ist es unwahrscheinlich, dass ein Phosphorylierungseffekt als Ursache für die im vorangegangenen Absatz beschriebene inhibierende Wirkung des TPH2-N-Terminus auf die enzymatische Aktivität in Betracht kommt.

Trotz aller offenen Fragen konnte die Phosphorylierbarkeit der TPH2 durch PKA und das Vorhandensein von mindestens einer weiteren Phosphorylierungsstelle zusätzlich zu Ser19 demonstriert werden.

#### 4.2.5 Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse über die biochemischen Eigenschaften der TPH2 und deren Bedeutung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die hTPH1 und 2 sowohl Homo - als auch Heterooligomere bilden können. Eine kurze Deletion von 17 bzw. 19 Aminosäuren vom C-Terminus verhindert durch eine Beschädigung der Oligomerisierungsdomäne die Bildung von Oligomeren und führt zu einer Verminderung der enzymatischen Aktivität. Die Deletion von 51 Aminosäuren (nahezu des kompletten Exons 11) hingegen verhindert nicht nur die Oligomerisierung, sondern bringt die Aktivität des Enzyms nahezu zum Erliegen. Eine Deletion der 44 N-terminalen Aminosäuren der TPH2 hingegen hebt die TPH-Aktivität um

das 3- bis 4-fache an. Deswegen scheint es sich bei dem N-Terminus um einen wichtigen regulatorischen Teil des Enzyms zu handeln, der seinen Einfluss vermutlich über Wechselwirkungen mit zentralen Teilen des Enzyms ausübt.

Wegen der starken Effekte, die sowohl N- als auch C-Terminus auf die TPH2-Aktivität haben, sind sie interessanten Angriffspunkten für eine pharmakologische Einflussnahme, wobei vor allem der N-Terminus aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung von Interesse ist. Denn trotz der Vielzahl der zur Behandlung von Depressionen eingesetzten Antidepressiva weisen all diese Medikamente erhebliche Nebenwirkungen auf, die das Wohlbefinden des Patienten zum Teil erheblich beeinträchtigen und häufig zu einem Therapieabbruch führen. Keine der heutzutage für die Therapie genutzten Substanzen nimmt direkten Einfluss auf die TPH-Aktivität. Im Tiermodell wird zwar häufig der effektive TPH-Inhibitor PCPA (Fratta et al., 73) eingesetzt, welcher nachweislich die 5-HT-Level in den behandelten Tieren verringert (O'leary et al., 07; Khan und Thomas, 01), bei den meisten Therapieansätzen ist aber keine Inhibition der 5-HT-Synthese sondern eine Steigerung der 5-HT-Neurotransmission erwünscht. Aufgrund dieses Defizits bei der Verfügbarkeit von TPH-aktivitätssteigernden Substanzen liegen die Ziele der heutigen pharmakologischen Interventionen eher im Bereich der 5-HT-Signaltransduktion, wobei häufig durch eine Hemmung des SERT (z.B. durch SSRIs) die Verweildauer des 5-HT im synaptischen Spalt und damit auch die Dauer der Signaltransduktion verlängert wird. Die Beeinflussung eines ganz am Anfang des 5-HT-Syntheseweges stehenden Enzyms wäre eine interessante Alternative und ist Gegenstand intensiver Forschung.

Der inhibitorische Effekt des N-Terminus auf die TPH2-Aktivität ist insofern ein Glücksfall, als dass eine Aufhebung dieser, vermutlich durch eine Interaktion mit dem Kernenzym bedingte Inhibition die Aktivität der TPH2 wie bei der  $\Delta N44$  Mutante ansteigen lassen würde und damit exakt dem gewünschten therapeutischen Effekt entspräche. Der N-Terminus der TPH2 ist aber nicht nur aufgrund seines großen Einflusses auf die TPH-Aktivität von Bedeutung. Da er eine TPH2-spezifische Struktur ist und bei der TPH1 komplett fehlt stellt er auch den hauptsächlichen Unterschied zwischen den beiden Isozymen dar, wodurch eine pharmakologische Einflussnahme auf diesen Enzymteil lediglich das serotonerge System des ZNS beeinflussen würde und ohne Auswirkung auf die Peripherie bliebe. Die Aufklärung der TPH2-Struktur durch Röntgenstrukturanalyse kann möglicherweise die Mechanismen aufklären, über welche die N- und C-Termini in die Regulation der katalytischen Aktivität verwickelt sind und die Modellierung von N- bzw. C-Terminus-bindenden Substanzen

ermöglichen, die durch ihre Interaktion mit den TPH2-Termini Auswirkungen auf die Struktur und somit auch die Aktivität haben könnten.

Weiterhin konnte die Phosphorylierung der TPH2 durch die PKA und die Existenz wenigstens einer weiteren PKA Phosphorylierungsstelle neben Ser19 (McKinney et al., 05) außerhalb des N-Terminus nachgewiesen werden, wobei des Ser104 sich als wahrscheinlicher Kandidat hervortat. Die Phosphorylierung scheint allerdings keinen Einfluss auf die TPH-Aktivität auszuüben.

### **4.3 TPH in der Pathogenese**

#### **4.3.1 Störung der serotonergen Systems einer Patientin**

Eine Patientin, die unter starken Schlafstörungen litt und deren Hausarzt bei ihr ein 5-HT-Defizit entdeckt hatte, bat um nähere Untersuchung ihre Erkrankung. Es konnten in der Tat ein Fehlen von 5-HT im Blut und eine gegenüber den Kontrollen signifikant reduzierte Sulfatoxymelatoninmenge (= Hauptmetabolit des aus 5-HT synthetisierten Melatonins) im Urin nachgewiesen werden. Allerdings muss bedacht werden, dass in der Literatur über eine erhebliche interindividuelle Variabilität der Melatonin- und damit auch Sulfatoxymelatoninlevel berichtet wird. Dabei wurden in der Nacht Werte im Bereich 18-40 pg/ml gemessen (Brown et al., 97). Die Melatoninsyntheserate wird nämlich von Alter, Geschlecht, Jahreszeit und bestimmten Erkrankungen beeinflusst, wobei bei verschiedenen pathophysiologischen Konditionen wie koronaren Herzerkrankungen (Brugger et al., 95), Schizophrenie (Fanget et al., 89) und chronischem Schmerz (Almay et al., 87) reduzierte Melatoninlevel beobachtet wurden. Aufgrund der Tatsache, dass die Patientin einen komplett gestörten und nicht mit den Kontrollpersonen zu vergleichenden Schlaf-Wach-Zyklus hatte, zusätzlich über allerlei andere Beschwerden wie z.B. chronische Schmerzen klagte und etwa 20 Jahre älter als die Kontrollpersonen war, ist ein Vergleich von Patientin und Kontrollen im Punkt Sulfatoxymelatoninlevel allerdings nicht uneingeschränkt möglich.

Der nichtsdestotrotz erfolgte Nachweis von Sulfatoxymelatonin bei der Patientin ließ darauf schließen, dass die 5-HT-Synthese als einzige Quelle für Melatonin und somit Sulfatoxymelatonin nicht vollständig zum Erliegen gekommen sein konnte, und dass höchstwahrscheinlich eine Aufnahme - bzw. Speicherungsstörung für 5-HT in die bzw. in den Thrombozyten vorlag. Bei der Sequenzierung der kodierenden Sequenzen der Gene der für die 5-HTP-Synthese in der Peripherie zuständigen TPH1 und des für die 5-HT-Aufnahme in die Thrombozyten zuständigen SERT konnten allerdings keine Mutationen festgestellt werden. Es erfolgte keine Sequenzierung der intronischen Sequenz und auch keine Analyse



des cDNA-Profiles bzw. der Proteinlevel der Patientin im Vergleich zu Kontrollpersonen. Diese Untersuchungen könnten wichtige Anhaltspunkte liefern, wurden aber wegen der Schwierigkeit und Unannehmlichkeiten, die mit der Entnahme von Biopsien aus den betreffenden Organen verbunden wären, unterlassen.

#### 4.3.2 TPH1 in endometrialen Karzinomen

Bei der Untersuchung einer großen Gruppe (149 Biopsien) von myometrialen und endometrialen Gewebeproben von endometrialen Karzinomen und gutartigen Wucherungen wurde festgestellt, dass die endometriale Gewebe der Karzinome (Gruppe 4) eine signifikant erhöhte TPH1-Expression aufwies. In den 3 anderen Gruppen war dahingegen so gut wie keine TPH1-mRNA detektierbar. Innerhalb der Gruppe 4 gab es aber eine starke Variabilität der TPH1-Level. In einigen dieser Tumore war nahezu keine TPH1-Expression nachweisbar, in anderen dahingegen konnten enorm hohe Mengen detektiert werden. Anhand der Expressionsergebnisse erfolgte eine weitere Einteilung der Gruppe der endometrialen Gewebeproben von endometrialen Karzinomen in 4 Kategorien, wobei der Kategorie I diejenigen Tumore zugeordnet wurden, die über eine dem TPH1-Level der gutartigen Wucherungen entsprechende, also extrem niedrige TPH1-Expression verfügten. Die Kategorie IV hingegen wurde von Tumoren gebildet, die eine gegenüber diesem Normalwert um das 25- bis 100-fache erhöhte Expression besaßen.

Eine gründlichere Untersuchung der Kategorien I und IV zeigte, dass die Gewebe der Kategorie IV zwar viel TPH1 enthielten aber kaum 5-HT. Die Tumore der Kategorie I hatten im Gegensatz dazu trotz ihrer niedrigen TPH1-Level einen hohen 5-HT-Gehalt. Die histologische Begutachtung und die Untersuchung der Östrogenrezeptordichte führte zu dem Ergebnis, dass die Kategorie I Tumore ein hohes Wachstumspotential besaßen und damit eine hohe Tumoraggressivität und eine schlechte Prognose für den Patienten bedeuteten. Bei Kategorie IV war das Gegenteil der Fall.

Um eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem 5-HT-Gehalt und den TPH1-Leveln zu finden, wurde die Expression mehrerer, damit möglicherweise in Verbindung stehender Komponenten des serotonergen Systems untersucht. Aber weder bei SERT, MAO-A, TG2, VMAT-1 oder VMAT-2 konnte ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Kategorien festgestellt werden.

Ein Unterschied in der NAT-Expression wäre eine weitere Erklärungsmöglichkeit gewesen, da die NAT das geschwindigkeitbestimmende Enzym der Melatoninsynthese aus 5-HT ist, und eine hohe NAT-Aktivität eine schnelle Weiterverarbeitung und damit niedrige Level von 5-HT

trotz hoher TPH1-Aktivität bedeuten könnte. Die NAT-Expression war allerdings so gering, dass sie nicht im RPA detektiert werden konnte. Es ist zwar unwahrscheinlich, dass ein so schwach exprimiertes Protein, welches einer derart starken TPH1-Expression gegenübersteht den beobachteten Effekt bewirken könnte, es ist aber auch nicht auszuschließen. Eine Bestimmung des Melatoningehalts der Tumore könnte diese Frage aber beantworten. Leider existieren nur sehr wenige Melatoninantikörper, die zudem eine starke Crossreaktivität mit anderen Tryptophanmetaboliten besitzen. Die verwendeten Antikörper gaben aber weder in den Tumoren noch in den Postivkontrollen ein Signal.

Ein erhöhtes Melatoninlevel in der stark TPH1-exprimierenden Kategorie IV würde auch mit den Einschätzung der niedrigen Aggressivität dieser Karzinome übereinstimmen, da das Melatoninlevel nachweislich verschiedene Krebsstadien bei Brustkrebs (Schernhammer et al., 06), Darmkrebs (Kos-Kudla et al., 02), Leberkrebs (Qin et al., 04), Hirntumoren (Mandera, 03), Prostatakarzinomen (Sainz et al., 05) und endometrialen Karzinomen (Grin und Grunberger, 98) positiv beeinflusst. Es wurde weiterhin gezeigt, dass Melatonin die Tumorangiogenese (Lissoni et al., 01), die Tumorphiliferation und Metastasenbildung (Cos et al., 98) inhibiert.

Die Kategorie I Karzinome mit ihrem hohen 5-HT-Gehalt und der niedrigen TPH1-Expression waren mit einer hohen Tumoraggressivität assoziiert. Passend zu diesen Daten wurde mehrfach gezeigt, dass 5-HT bei verschiedenen Karzinomen eine mitogene, also eine das Tumorwachstum autokrin stimulierende Wirkung (Cattaneo et al., 93a; Hegedus et al., 87; Ishizuka et al., 92) besitzt.

Tumore mit einer hohen Wachstumsrate sind für gewöhnlich durch eine starke Vaskularisierung charakterisiert. Dies könnte die hohen 5-HT-Level bei geringer TPH1-Expression in der Kategorie I im Gegensatz zur 5-HT-armen, langsam wachsenden, vermutlich schlecht vaskularisierten Kategorie IV erklären. Das 5-HT wurde nämlich hauptsächlich in der direkten Umgebung von Blutgefäßen detektiert.

Um mit dem serotonergen System verknüpfte Gene zu identifizieren, die in Kategorie I und IV unterschiedlich reguliert sind und damit zu der beobachteten Diskrepanz zwischen 5-HT und TPH1 führen könnten, wäre sicherlich eine Affymetrixanalyse der beiden Karzinomkategorien hilfreich. Es existieren bereits Affymetrixdaten zu endometrialen Karzinomen (Ferguson et al., 05; Ferguson et al., 06; Mutter et al., 01; Wong et al., 06), die allerdings nicht zwischen den beiden beschriebenen Kategorien differenzieren und somit zur Beantwortung der gegebenen Fragestellung ungeeignet sind.

Obwohl keine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den 5-HT- und TPH1-Leveln gefunden werden konnte, wurde dennoch die Expression von TPH1-mRNA als Marker für endometriale Karzinome identifiziert. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen 5-HT- und TPH1-Gehalt und der Aggressivität des Tumors und der daraus resultierenden Patientenprognose gefunden werden. Hohe TPH1-Level bei gleichzeitig niedrigem 5-HT-Gehalt waren generell mit einem geringen Tumorwachstum und einer guten Prognose für den betroffenen Patienten assoziiert, wohingegen niedrigen TPH1-Level und ein hoher 5-HT-Gehalt mit einem großen Wachstumspotential und einer schlechten Prognose einhergingen.

#### 4.3.3 Einfluss eines mTPH2 SNPs auf das serotonerge System und Verhalten von Mäusen

Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 04) berichteten über einen SNP<sub>C1473G</sub> in der codierenden Gensequenz der mTPH2, der zu einer Substitution des Prolins 447 durch ein Arginin und zu einer 55 %igen Reduktion der 5-HT-Level in mit den entsprechenden Konstrukten transfizierten PC12 Zellen führt. Weiterhin zeigten Zhang *et al.*, dass in BALB/c Mäusen, die homozygot für das 1473G Allel sind, der Hirngehalt an 5-HT und die 5-HTP-Synthese im Vergleich zu C57BL/6 und 129X1/SvJ Mäusen, die das 1473C Allel homozygot in sich tragen, um ~ 40 % bzw. ~ 60 % reduziert sind. Weiterhin zitierten sie Studien, die 5-HT-bedingte Verhaltensänderungen zwischen C- und G-Allel Mausestämmen beobachteten (Lucki *et al.*, 01). Deswegen postulieren sie eine bedeutende Rolle der TPH2 bei der 5-HT-Synthese im Hirn und bei der Modulation des Verhaltens. Die Studie kann allerdings nicht ausschließen, dass die beobachteten Unterschiede nicht durch Veränderungen in der TPH-Aktivität, sondern durch Variation im genetischen Hintergrund der verschiedenen Stämme hervorgerufen werden.

In der Literatur gibt es bereits Hinweise darauf, dass die Verhaltensunterschiede der Stämme nicht unbedingt dem von Zhang *et al.* vorgeschlagenen, SNP-abhängigen Muster folgen. So wurden zwar z.B. unter Nutzung des FST (Porsolt *et al.*, 77), einem weithin genutzten Testverfahren zur Einschätzung des potentiellen antidepressiven Effektes von Medikamenten, gezeigt, dass der SSRI Citalopram die Immobilitätszeit von C57BL/6 und 129/Sv mTPH2<sub>1473C/C</sub>-Mäusen reduzieren kann, aber keinen Einfluss auf DBA/2J und BALB/c mTPH2<sub>1473G/G</sub>-Mäuse hat (Cervo *et al.*, 05). Beim Vergleich des stammabhängigen Effekts von Citalopram unter Anwendung des Tail Suspension Tests (TST), einem weiteren Verfahren zur Bestimmung des antidepressiven Potentials von Substanzen (Perrault *et al.*, 92; Steru *et al.*, 85), konnte aber keine Verbindung zwischen dem C1473G Polymorphismus der mTPH2 und der Reaktion im TST festgestellt werden (Crowley *et al.*, 05). Andere Studien haben

gezeigt, dass der SNP<sub>C1473G</sub> der mTPH2 mit gesteigertem aggressiven Verhalten assoziiert ist (Kulikov et al., 05a), jedoch nicht mit impulsiven Verhalten beim Delayed Reinforcement Task Test (Isles et al., 05). Bei all diesen Verhaltensstudien muss immer zusätzlich bedacht werden, dass Genotyp-Umwelt Interaktionen Unterschiede im Verhaltensphänotyp bewirken könnten, die den Vergleich zwischen verschiedenen Laboratorien problematisch gestalten (Crabbe et al., 99; Kafkafi et al., 05; Wahlsten et al., 03).

Um zunächst die konkreten kinetischen Parameter der beiden TPH2-Isoformen zu bestimmen, wurden full-length mTPH2<sub>447P</sub> und mTPH2<sub>447R</sub> Enzyme in COS7 Zellen exprimiert. Die von Zhang *et al.* (Zhang et al., 04) nur anhand der 5-HT-Level von TPH2-transfizierten Zellen beschriebene niedrigere Aktivität der mTPH2<sub>447R</sub> konnte durch der gewonnen kinetischen Daten bestätigt werden. Es wurden  $K_m$ -Werte von 860 und 343  $\mu\text{M}$  Trp und  $V_{\max}$ -Werte von 100 und 36 % für mTPH2<sub>447P</sub> und mTPH2<sub>447R</sub> (unter Nutzung des synthetischen Kofaktors 6MPH4 (300  $\mu\text{M}$ )) gemessen. Diese Werte werden auch durch Daten von Sakowski *et al.* (Sakowski et al., 06a) bestätigt, der  $K_m$ -Werte von 71.2 und 46.6  $\mu\text{M}$  Trp und  $V_{\max}$ -Werte von 41.5 und 20.3 nmol/mg/min für bakteriell exprimierte mTPH2<sub>447P</sub> und mTPH2<sub>447R</sub> (unter Nutzung des natürlichen Kofaktors BH4 (200  $\mu\text{M}$ )) maß.

Um die Frage nach der tatsächlichen funktionellen Bedeutung der TPH2 für das Verhalten zu klären, wurde das 1473G Allel von DBA/2 Mäusen über 8 Generationen auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt, um congenetische Mäuse zu erhalten, die entweder das mTPH2<sub>1473C/C</sub>- oder mTPH2<sub>1473G/G</sub>-Allel trugen. Die Messung der 5-HT-Level in verschiedenen Hirnregionen der Mäuse ergab keine signifikanten Unterschiede. Auch mit Hilfe zweier, häufig zur Überprüfung von 5-HT-basierten Verhaltensänderungen genutzten Tests (Elevated Plus Maze Test und Forced Swimming Test) konnten keine signifikanten Unterschiede im Angst- und depressionsähnlichem Verhalten der Mäuse detektiert werden, was aufgrund der unveränderten 5-HT-Level auch nicht zu erwarten gewesen wäre. Die Möglichkeit, dass die fehlenden Veränderungen durch eine kompensatorische Hochregulation der mTPH2<sub>447R</sub>-Expression hervorgerufen worden sein könnten, wurde durch eine Überprüfung der Expressionslevel von TPH2<sub>447P</sub> und TPH2<sub>447R</sub> im Hirnstamm ausgeschlossen.

Die Diskrepanz zwischen den verschiedenen kinetischen Parametern der beiden TPH2-Isoformen auf der einen und dem keine Veränderungen aufzeigenden 5-HT-Gehalt der Hirnregionen und Verhalten auf der anderen Seite kann durch die Tryptophankonzentration im Hirn der Tiere erklärt werden. Es konnten in Abhängigkeit von der jeweiligen Hirnregion in beiden Mausstämmen Werte von 12-17  $\mu\text{M}$  gemessen werden. Bei diesen niedrigen Tryptophankonzentrationen ist die Aktivität der mTPH2<sub>447P</sub> and mTPH2<sub>447R</sub> unter Nutzung

des natürlichen Kofaktors BH4 (Sakowski et al., 06a) aufgrund der Tatsache, dass die Mutante zwar einen verringerten  $V_{\max}$  aber gleichzeitig einen niedrigeren  $K_m$ -Wert hat, nahezu gleich hoch und es sind folglich auch keine Unterschiede in der 5-HT-Syntheserate und dem 5-HT-Gehalt des Hirns zu erwarten.

Generell lässt sich daraus schlussfolgern, dass aufgrund der niedrigen und somit limitierend wirkenden Tryptophankonzentrationen im Gehirn eine starke, mutationsbedingte Aktivitätsänderung der TPH2 nur dann einen signifikanten Einfluss auf die 5-HT-Synthese hätte, wenn sie nicht nur in einer  $V_{\max}$ -Senkung sondern auch in einer gleichzeitigen  $K_m$ -Erhöhung bzw. -Konstanz resultieren würde. Gleiches gilt natürlich auch für den Einfluss von TPH-aktivitätsbeeinflussenden Substanzen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bei den mTPH2<sub>1473C/C</sub>- und mTPH2<sub>1473G/G</sub>-Mausstämmen beobachteten Unterschiede im 5-HT-Hirngehalt und Verhalten nicht, wie von Zhang *et al.* (Zhang et al., 04) behauptet, durch SNP<sub>C1473G</sub>-basierte Unterschiede in der TPH2-Aktivität sondern durch andere Variationen des genetischen Hintergrundes bedingt werden.

#### **4.4 High-Throughput-Assay zur Bestimmung der TPH-Aktivität**

Eine Vielzahl von Erkrankungen in Peripherie und ZNS wird durch Dysfunktionen des serotonergen Systems ausgelöst. Eine der bedeutendste dieser Erkrankungen ist die Depression. Wie bereits erwähnt werden zu ihrer Behandlung in Ermangelung anderer Substanzen immer noch Medikamente mit massiven Nebenwirkungen eingesetzt. Aufgrund dieser Tatsache ist die Entdeckung neuer, das serotonerge System beeinflussender Wirkstoffe immer noch ein wichtiges Ziel der pharmakologischen Forschung. Da die TPH ein für die 5-HT-Synthese entscheidendes Enzym ist, stellt ihre Beeinflussung natürlich einen möglichen Angriffspunkt für die Beeinflussung des gesamten serotonergen Systems dar.

Für die Suche nach TPH-aktivitätsbeeinflussenden Substanzen wurde deswegen ein High-Throughput-Assay zur Detektion von TPH-Aktivität im 96-Well-Format entwickelt. Dazu wurden zunächst zwei Zelllinien identifiziert, die jeweils nur eines der TPH-Isozyme exprimierten. Die P815 Zellen (Mastocytomazellen) stellten sich als TPH1-exprimierende Zelllinie heraus, die TT Zellen (Thyroidkarzinomzellen) als TPH2-Zelllinie. Das hohe TPH1-Level in den P815 Zellen und ihr schnelles Wachstum machten sie zu einem idealen Kandidaten für den Assay. Die TT Zellen hingegen zeigten ein extrem langsames Wachstum mit lediglich einer Zellteilung/Wochen und hatten extrem niedrige TPH2-Level. Sie kamen also leider als Modell für TPH2-Aktivität im High-Throughput-Assay nicht in Frage. Die P815 Zellen enthielten neben hohe 5-HTP-Mengen auch hohe 5-HT-Konzentrationen und

verfügten somit nachweislich über zelleigene AAAD Aktivität. Als Kontrollzelllinien, bei denen weder TPH1- noch TPH2-Expression, 5-HTP oder 5-HT nachgewiesen werden konnten, dienten COS7 und HEK293 Zellen.

Für das Prinzip des Assays spielte das 5-HTP-Derivat 7-HTP (Walther et al., 02) eine zentrale Rolle. 7-HTP wird von der TPH als alternatives Substrat erkannt und in 5,7-DHTP umgewandelt. 5,7-DHTP wiederum wird von der AAAD zu dem bekannten Neurotoxin 5,7-DHT metabolisiert. Das 7-HTP wird von den Zellen durch den ubiquitär exprimierten LAAT aufgenommen, kann seine toxische Wirkung über die Metabolisierung zu 5,7-DHT aber nur dort entfalten, wo eine TPH-Aktivität vorhanden ist. Die Toxizität des 7-HTP ist also direkt von der Aktivität der TPH abhängig. Bei nicht vorhandener TPH-Aktivität wird 7-HTP nicht umgesetzt und es entstehen auch keine toxischen Metaboliten, die der Zelle Schaden zufügen können. Bei hoher TPH-Aktivität hingegen wird viel 7-HTP umgesetzt, es entsteht viel zytotoxischer Metabolit und die Zellen sterben. Diese Eigenschaft des 7-HTP wurde in dem Assay mit einer fluorometrischen, Calcein-AM basierten Messung des Vitalitätszustandes der Zellen kombiniert. Das nicht-fluoregene Calcein-AM passiert die Zytoplasmamembran und wird im Zellinneren vitaler Zellen durch die zelleigenen Esterasen in fluorogenes Calcein und Acetoxymethyl (AM) gespalten. In toten Zellen ist keine Esteraseaktivität mehr vorhanden und das Calcein-AM bleibt intakt und nicht-fluorogen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im 96-Well-Plattenleser (Anregung bei 490 nm; Emission bei 515 nm).

Die lineare Beziehung zwischen Calcein-bedingter Fluoreszenz und der Anzahl vitaler Zellen und somit die Funktionalität des Prinzips der fluoreszenzbasierten Vitalitätsmessung konnte für die im Assay verwendeten Zelllinien P815, HEK293 und COS7 demonstriert werden. Auch die erwartete Korrelation von 7-HTP induziertem Zelltod und TPH-Aktivität war vorhanden. P815 Zellen starben bei einer 7-HTP Konzentrationen von 3 mM ab und konnten durch die Zugabe von 5  $\mu$ M des bekannten TPH-Aktivitätsinhibitors PCPA teilweise gerettet werden. Auf COS7 und HEK293 Zellen blieb 7-HTP ohne Auswirkung.

Leider musste aber festgestellt werden, dass sich der Assay trotz aufwendiger Optimierungsarbeit und im Bereich des Machbaren gleicher Rahmenbedingungen als extrem instabil herausstellte und das „gewünschte“ Ergebnis nicht immer eintraf, da manchmal der Zelltod der P815 Zellen nicht durch Zugabe von 7-HTP ausgelöst werden konnte bzw. alle Zellen massiv abstarben. Vermutlich sind diese Schwankungen auf geringste Veränderungen in der Aussaatdichte der P815 Zellen, auf kleine Konzentrationsschwankungen der nur sehr gering wasserlöslichen Substanzen PCPA und 7-HTP und auf leichte Variationen der Inkubationszeiten und -zeitpunkte zurückzuführen. Eine Optimierung des Assays durch

Einsatz von Pipettierrobotern und eine weitere Stabilisierung der Rahmenbedingungen könnte die beobachteten Schwankungen ausmerzen. Damit wäre der Assay dann für ein High-Throughput-Screening nach TPH-aktivitätsbeeinflussenden Substanzen einsetzbar.

Eine weitere Verbesserung der Stabilität würde zweifelsohne durch eine Löslösung vom Zellsystem erreicht werden. Der Einsatz von bakteriell exprimierter, aufgereinigter TPH als Kernstück des Assays würde sich als Lösung für dieses Problem anbieten. Ein Nachteil bei der Nutzung von bakteriell exprimiertem Protein wäre allerdings das bereits angesprochene Fehlen eines nativen System, wie der TPH1-exprimierenden P815 Zellen, das alle möglichen Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) und Interaktionspartner (14-3-3), die einen Einfluss auf die TPH-Aktivität und deren Beeinflussung haben könnten, bereitstellen würde. Das Fehlen dieser „natürlichen Umgebung“ könnte den Erfolg des Screenings vermindern.

#### **4.5 Tubulin $\beta$ 2A – ein TPH2 Interaktionspartner**

Beim „Interaction Mating“-basierten Y2H-Screening (Stelzl et al., 05) konnten 3 mögliche TPH2-Interaktionspartner identifiziert werden: das Zytoskelettprotein Tubulin $\beta$ 2A (TUBB), das Purkinjezellen spezifische Protein PEP-19 (Chen et al., 96) und der SWI/SNF verwandte, matrixassoziierte, aktinabhängige Chromatinregulator SMARCB1 (Muchardt et al., 95; Wang et al., 96). Das full-length SMARCB1 Protein konnte leider nicht in COS7 Zellen exprimiert werden. Bei PEP gelang lediglich eine bakterielle Expression als MBP-gekoppeltes Protein. Eine Interaktion mit der TPH2FLAG konnte durch ein Koimmunopräzipitation nur für TUBBmyc nachgewiesen werden. In mit TUBBmyc und TPHFLAG kotransfizierten COS7 Zellen wurde auch die Kolokalisation beider Proteine gezeigt. Der Versuch, die Kolokalisation auch in zu serotonergen Neuronen ausdifferenzierten ES-Zellen nachzuweisen, misslang leider, da selbst unter Nutzung eines konfokalen Mikroskops die Tubulinstruktur der Axone nicht differenziert sichtbar gemacht werden konnte.

Tubulin $\beta$ 2 ist die Hauptform des Tubulins in Neuronen. Dort bildet es zusammen mit Tubulin $\alpha$  den Hauptbestandteil der Mikrotubuli. Tubulin $\beta$ 2 ist aber nicht neuronenspezifisch und kommt auch in anderen Zelltypen vor (Hoffman und Cleveland, 88). Eine nahe liegende Vorstellung ist, dass die Interaktion von TPH2 und Tubulin $\beta$ 2A möglicherweise mit einem mikrotubuliassoziierten anterograden Transport der TPH2 aus dem Soma in die Axone im Zusammenhang stehen könnte. Nach der konventionellen Vorstellung wird der anterograde Transportvorgang von Substanzen über eine Wechselwirkung dieser mit dem Motorprotein Kinesin oder alternativen Motorproteinen bewerkstelligt und nicht über eine direkte Interaktion des zu transportierenden Objekts mit dem Tubulin. Außerdem werden beim

axonalen Transport hauptsächlich membranumhüllte Organellen, wie Vorstufen synaptische Vesikel mit verschiedenen Inhalten (Yonekawa et al., 98; Nakata et al., 98) oder Mitochondrien (Nangaku et al., 94; Tanaka et al., 98), und keine reinen Enzyme transportiert. Es gibt aber auch Belege dafür, dass kurze, nur wenige  $\mu\text{M}$  lange Mikrotubulistücke mit Hilfe des langsamen axonalen Transports durch konventionelle Motorproteine mit einer Geschwindigkeit von 0,2 bis 3 mm/Tag entlang der Axone transportiert werden (Baas et al., 05; Wang und Brown, 02). Eine Bindung der TPH2 an Tubulin $\beta$ 2A würde auf diesem Wege zu einem Transport der TPH aus dem Soma in die Axone (in Richtung der Synapse) führen, wo die TPH2 dann direkt die 5-HT-Synthese einleiten könnte. Diese lokale Synthese würde in Ergänzung zum durch den axonalen Vesikeltransport angelieferten 5-HT eine zusätzliche 5-HT-Quelle im Axon-/Synapsenbereich darstellen.

In der Tat gibt es Studien, die eine Assoziation von TPH-Protein mit den Mikrotubuli in den Axonen und Dendriten von serotonergen Neuronen und eine diffuse Verteilung der TPH im Zytoplasma des Soma belegen (Joh et al., 75). Diese Kollokalisierung mit den Mikrotubuli wurde auch bei der mit der TPH eng verwandten TH festgestellt (Pickel et al., 75b; Pickel et al., 75a). Für die TH konnte nicht nur die Kollokalisierung, sondern auch ein axonaler Transportvorgang mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 mm/Tag festgestellt werden (Jarrott und Geffen, 72). Aufgrund der Tatsache, dass sich in dieser Studie Norepinephrinevesikel mit einer ähnlichen Geschwindigkeit von  $\sim 2,5$  mm/Tag entlang der Mikrotubuli bewegten, wurde vorgeschlagen, dass die TH während ihres axonalen Transports mit den Norepinephrinvesikeln assoziiert ist (Jarrott und Geffen, 72). Aufgrund der Sequenzhomologien der AAAHs TH und TPH und der nun entdeckten Tubulininteraktion der TPH2 ist es möglich, dass beide Enzyme nicht, wie für die TH vorgeschlagen, vesikelassoziiert an den Mikrotubuli entlang transportiert werden, sondern an kurze Mikrotubulistücke gebunden sind, die von den Motorproteinen am Axon entlang bewegt werden.

Die Interaktionsdomäne der TPH2 mit Tubulin $\beta$ 2A ließ sich anhand der Ergebnisse des Y2H, welches mit einzelnen und kombinierten TPH2-Domänen durchgeführt wurde, auf einen Sequenzbereich innerhalb der katalytischen TPH2-Domäne eingrenzen. Als nächster Schritt wäre sicherlich die Identifizierung der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren mit Hilfe von Deletions- und Punktmutanten sinnvoll. Eine knock-in Maus mit einer Tubulin $\beta$ 2A-interaktionsunfähigen TPH2-Mutante könnte im Anschluss Aufschluss über die Auswirkungen einer fehlenden Interaktion geben. Möglicherweise könnte das Fehlen einer



innersynaptischen 5-HT-Synthese durch die antransportierte TPH2 zu einem 5-HT-Defizit und damit zu einer ernsthaften Störung der 5-HT-vermittelten Neurotransmission führen.

Ob SMARCB1 als tatsächlicher Interaktionspartner der TPH2 agiert oder nur ein falschpositives Ergebnis des Screenings ist, bleibt fraglich, da das full-length SMARCB1 Protein leider nicht erfolgreich exprimiert werden konnte. In seiner Funktion als chromatinmodulierendes Protein ist es allerdings im Zellkern und die TPH2 dahingegen im Zytosol lokalisiert, was eine tatsächliche Interaktion unwahrscheinlich macht. Die Tatsache, dass SMARCB1 dennoch im Y2H-Screening als TPH2-Interaktionspartner identifiziert werden konnte, ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass das beim Screening verwendete SMARCB1 lediglich den C-terminalen Teil des Proteins enthielt und nicht den kompletten ORF. Diesem verkürzten Protein fehlte somit automatisch das N-terminale NLS (nuclear localization signal) und es befand sich dadurch, anders als im natürlichen Zustand, zusammen mit der TPH2 im Zytoplasma der Zelle und nicht im Zellkern.

Die nicht nachweisbare Interaktion der TPH2 mit PEP-MBP könnte vielleicht auf den Fusionszustand des Proteins oder auf allgemeine Modifikationsfehler durch die bakterielle Expression zurückzuführen sein. Das durch eine Abspaltung vom MBP generierte PEPmyc war nur ~ 7.6 kDa groß, sehr instabil, im Westernblott nicht mehr nachweisbar und dadurch auch nicht erfolgreich bei der IP einsetzbar.

Zusammenfassend konnte durch das Y2H-Screening Tubulin $\beta$ 2A als TPH2-Interaktionspartner identifiziert werden. Darüber hinaus liegt die Annahme nahe, dass diese Interaktion dem anterograden Transport der TPH2 vom Neuronensoma zur Synapse dient, wo die TPH2 durch einen lokalen 5-HT-Synthesevorgang die Konzentration des in Vesikeln antransportierten 5-HT erhöht.

# Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J.; Ronnback, L. und Hansson, E. (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nat.Rev.Neurosci.* (Band 7), Nr. 1, Seite 41-53.
- Aguilar, R.; Anton, F.; Bellido, C.; Aguilar, E. und Gaytan, F. (1995): Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat, *J.Endocrinol.* (Band 146), Nr. 1, Seite 15-21.
- Akiskal, H. S. und McKinney, W. T., Jr. (1973): Depressive disorders: toward a unified hypothesis, *Science.* (Band 182), Nr. 107, Seite 20-29.
- Almay, B. G.; von Knorring, L. und Wetterberg, L. (1987): Melatonin in serum and urine in patients with idiopathic pain syndromes, *Psychiatry Res.* (Band 22), Nr. 3, Seite 179-191.
- Angst, J.; Woggon, B. und Schoepf, J. (1977): The treatment of depression with L-5-hydroxytryptophan versus imipramine. Results of two open and one double-blind study, *Arch.Psychiatr.Nervenkr.* (Band 224), Nr. 2, Seite 175-186.
- Arendt, J. (1995): Melatonin and the mammalian pineal gland, Chapman & Hall, London.
- Auerbach, S. und Lipton, P. (1985): Regulation of serotonin release from the in vitro rat hippocampus: effects of alterations in levels of depolarization and in rates of serotonin metabolism, *J.Neurochem.* (Band 44), Nr. 4, Seite 1116-1130.
- Austin, M. C. und O'Donnell, S. M. (1999): Regional distribution and cellular expression of tryptophan hydroxylase messenger RNA in postmortem human brainstem and pineal gland, *J.Neurochem.* (Band 72), Nr. 5, Seite 2065-2073.
- Baas, P. W.; Karabay, A. und Qiang, L. (2005): Microtubules cut and run, *Trends Cell Biol.* (Band 15), Nr. 10, Seite 518-524.
- Bach-Mizrahi, H.; Underwood, M. D.; Kassir, S. A.; Bakalian, M. J.; Sibille, E.; Tamir, H.; Mann, J. J. und Arango, V. (2006): Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide, *Neuropsychopharmacology.* (Band 31), Nr. 4, Seite 814-824.
- Badawy, A. A. (1999): Tryptophan metabolism in alcoholism, *Adv.Exp.Med.Biol.* (Band 467:265-74.), Seite 265-274.
- Banik, U.; Wang, G. A.; Wagner, P. D. und Kaufman, S. (1997): Interaction of phosphorylated tryptophan hydroxylase with 14-3-3 proteins, *J.Biol.Chem.* (Band 272), Nr. 42, Seite 26219-26225.
- Barbosa, R. M.; Silva, A. M.; Tome, A. R.; Stamford, J. A.; Santos, R. M. und Rosario, L. M. (1998): Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics, *J.Physiol.* (Band 510), Nr. Pt 1, Seite 135-143.
- Barnes, N. M. und Sharp, T. (1999): A review of central 5-HT receptors and their function, *Neuropharmacology.* (Band 38), Nr. 8, Seite 1083-1152.
- Beckmann, H. (1978): [Biochemical basis of endogenous depression (author's transl)], *Nervenarzt.* (Band 49), Nr. 10, Seite 557-568.
- Beckmann, H. (1983): Neurobiologie und Biochemie der Depression - Überblick über den gegenwärtigen Wissensstand, Seite 28-37, Huber, Bern.
- Bell, C. J. und Nutt, D. J. (1998): Serotonin and panic, *Br.J.Psychiatry.* (Band 172:465-71.), Seite 465-471.
- Bicalho, M. A.; Pimenta, G. J.; Neves, F. S.; Correa, H.; de Moraes, E. N.; De Marco, L. und Romano-Silva, M. A. (2006): Genotyping of the G1463A (Arg441His) TPH2 polymorphism in a geriatric population of patients with major depression, *Mol.Psychiatry.* (Band 11), Nr. 9, Seite 799-800.
- Birkmayer, W. und Riederer, P. (1975): Biochemical post-mortem findings in depressed patients, *J.Neural Transm.* (Band 37), Nr. 2, Seite 95-109.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* (Band 7), Nr. 6, Seite 1513-1523.
- Black, D. L. (1992): Activation of c-src neuron-specific splicing by an unusual RNA element in vivo and in vitro, *Cell.* (Band 69), Nr. 5, Seite 795-807.
- Blakely, R. D. (2005): Overview: a rare opportunity or just one less reason to be depressed, *Neuron.* (Band 48), Nr. 5, Seite 701-702.
- Bono, G.; Criscuoli, M.; Martignoni, E.; Salmon, S. und Nappi, G. (1982): Serotonin precursors in migraine prophylaxis, *Adv.Neurol.* (Band 33:357-63.), Seite 357-363.

- Borman, R. A. und Burleigh, D. E. (1993): Evidence for the involvement of a 5-HT<sub>4</sub> receptor in the secretory response of human small intestine to 5-HT, *Br.J.Pharmacol.* (Band 110), Nr. 3, Seite 927-928.
- Boston, P. F.; Jackson, P. und Thompson, R. J. (1982): Human 14-3-3 protein: radioimmunoassay, tissue distribution, and cerebrospinal fluid levels in patients with neurological disorders, *J.Neurochem.* (Band 38), Nr. 5, Seite 1475-1482.
- Bowsher, R. R. und Henry, D. P. (1986): Aromatic L-amino acid decarboxylase: biochemistry and functional significance, Boulton, A. A.; Baker, G. B. und Yu, P. H., *Neuromethods*, Seite 33-77, Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Breathnach, R.; Benoist, C.; O'Hare, K.; Gannon, F. und Chambon, P. (1978): Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (Band 75), Nr. 10, Seite 4853-4857.
- Breathnach, R. und Chambon, P. (1981): Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins, *Annu.Rev.Biochem.* (Band 50:349-83.), Seite 349-383.
- BRODIE, B. B.; KUNTZMAN, R.; HIRSCH, C. W. und COSTA, E. (1962): Effects of decarboxylase inhibition on the biosynthesis of brain monoamines, *Life Sci.* (Band 1:81-4.), Seite 81-84.
- Brown, E. N.; Choe, Y.; Shanahan, T. L. und Czeisler, C. A. (1997): A mathematical model of diurnal variations in human plasma melatonin levels, *Am.J.Physiol.* (Band 272), Nr. 3 Pt 1, Seite E506-E516.
- Brugger, P.; Marktl, W. und Herold, M. (1995): Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease, *Lancet.* (Band 345), Nr. 8962, Seite 1408.
- Burge, C. B.; Padgett, R. A. und Sharp, P. A. (1998): Evolutionary fates and origins of U12-type introns, *Mol.Cell.* (Band 2), Nr. 6, Seite 773-785.
- Bussow, K.; Cahill, D.; Nietfeld, W.; Bancroft, D.; Scherzinger, E.; Lehrach, H. und Walter, G. (1998): A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library, *Nucleic Acids Res.* (Band 26), Nr. 21, Seite 5007-5008.
- Carboni, E.; Cadoni, C.; Tanda, G. L. und Di Chiara, G. (1989): Calcium-dependent, tetrodotoxin-sensitive stimulation of cortical serotonin release after a tryptophan load, *J.Neurochem.* (Band 53), Nr. 3, Seite 976-978.
- Carkaci-Salli, N.; Flanagan, J. M.; Martz, M. K.; Salli, U.; Walther, D. J.; Bader, M. und Vrana, K. E. (2006): Functional domains of human tryptophan hydroxylase 2 (hTPH2), *J.Biol.Chem.* (Band 281), Seite 28105-28112.
- Carlsson, A. und Lindqvist, M. (1972): The effect of L-tryptophan and some psychotropic drugs on the formation of 5-hydroxytryptophan in the mouse brain in vivo, *J.Neural Transm.* (Band 33), Nr. 1, Seite 23-43.
- Carrasco, G.; Cruz, M. A.; Dominguez, A.; Gallardo, V.; Miguel, P. und Gonzalez, C. (2000a): The expression and activity of monoamine oxidase A, but not of the serotonin transporter, is decreased in human placenta from pre-eclamptic pregnancies, *Life Sci.* (Band 67), Nr. 24, Seite 2961-2969.
- Carrasco, G.; Cruz, M. A.; Gallardo, V.; Miguel, P.; Dominguez, A. und Gonzalez, C. (2000b): Transport and metabolism of serotonin in the human placenta from normal and severely pre-eclamptic pregnancies, *Gynecol.Obstet.Invest.* (Band 49), Nr. 3, Seite 150-155.
- Cash, C. D. (1998): Why tryptophan hydroxylase is difficult to purify: a reactive oxygen-derived species-mediated phenomenon that may be implicated in human pathology, *Gen.Pharmacol.* (Band 30), Nr. 4, Seite 569-574.
- Cash, C. D.; Vayer, P.; Mandel, P. und Maitre, M. (1985): Tryptophan 5-hydroxylase. Rapid purification from whole rat brain and production of a specific antiserum, *Eur.J.Biochem.* (Band 149), Nr. 2, Seite 239-245.
- Cattaneo, M. G.; Codignola, A.; Vicentini, L. M.; Clementi, F. und Sher, E. (1993b): Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma, *Cancer Res.* (Band 53), Nr. 22, Seite 5566-5568.
- Cervo, L.; Canetta, A.; Calcagno, E.; Burbassi, S.; Sacchetti, G.; Caccia, S.; Fracasso, C.; Albani, D.; Forloni, G. und Invernizzi, R. W. (2005): Genotype-dependent activity of tryptophan hydroxylase-2 determines the response to citalopram in a mouse model of depression, *J.Neurosci.* (Band 25), Nr. 36, Seite 8165-8172.
- Champier, J.; Claustrat, B.; Besancon, R.; Eymin, C.; Killer, C.; Jouvett, A.; Chamba, G. und Fevre-Montange, M. (1997): Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets, *Life Sci.* (Band 60), Nr. 24, Seite 2191-2197.

- Chen, H.; Bouras, C. und Antonarakis, S. E. (1996): Cloning of the cDNA for a human homolog of the rat PEP-19 gene and mapping to chromosome 21q22.2-q22.3, *Hum.Genet.* (Band 98), Nr. 6, Seite 672-677.
- Chugani, D. C. (2002): Role of altered brain serotonin mechanisms in autism, *Mol.Psychiatry.* (Band 7 Suppl 2:S16-7.), Seite S16-S17.
- Chung, Y. I.; Park, D. H.; Kim, M.; Baker, H. und Joh, T. H. (2001): Immunochemical characterization of brain and pineal tryptophan hydroxylase, *J.Korean Med.Sci.* (Band 16), Nr. 4, Seite 489-497.
- Collins, G. G.; Sandler, M.; Williams, E. D. und Youdim, M. B. (1970): Multiple forms of human brain mitochondrial monoamine oxidase, *Nature.* (Band 225), Nr. 5235, Seite 817-820.
- Consolazione, A. und Cuello, A. C. (1982): CNS serotonin pathways, *The biology of serotonergic transmission*, Seite 29-61, John Wiley & Sons, New York.
- Coppen, A. (1967): The biochemistry of affective disorders, *Br.J.Psychiatry.* (Band 113), Nr. 504, Seite 1237-1264.
- Coppen, A. J. und Doogan, D. P. (1988): Serotonin and its place in the pathogenesis of depression, *J.Clin.Psychiatry.* (Band 49 Suppl:4-11.), Seite 4-11.
- Cos, S.; Fernandez, R.; Guezmes, A. und Sanchez-Barcelo, E. J. (1998): Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells, *Cancer Res.* (Band 58), Nr. 19, Seite 4383-4390.
- Cote, F.; Thevenot, E.; Fligny, C.; Fromes, Y.; Darmon, M.; Ripoché, M. A.; Bayard, E.; Hanoun, N.; Saurini, F.; Lechat, P.; Dandolo, L.; Hamon, M.; Mallet, J. und Vojdani, G. (2003): Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (Band 100), Nr. 23, Seite 13525-13530.
- Crabbe, J. C.; Wahlsten, D. und Dudek, B. C. (1999): Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment, *Science.* (Band 284), Nr. 5420, Seite 1670-1672.
- Crowley, J. J.; Blendy, J. A. und Lucki, I. (2005): Strain-dependent antidepressant-like effects of citalopram in the mouse tail suspension test, *Psychopharmacology (Berl).* (Band 183), Nr. 2, Seite 257-264.
- Cryan, J. F.; Mombereau, C. und Vassout, A. (2005): The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice, *Neurosci.Biobehav.Rev.* (Band 29), Nr. 4-5, Seite 571-625.
- D'Sa, C. M.; Arthur, R. E., Jr. und Kuhn, D. M. (1996): Expression and deletion mutagenesis of tryptophan hydroxylase fusion proteins: delineation of the enzyme catalytic core, *J.Neurochem.* (Band 67), Nr. 3, Seite 917-926.
- Dahlstrom, A. und Fuxe, K. (1964): Localization of monoamines in the lower brain stem, *Experientia.* (Band 20), Nr. 7, Seite 398-399.
- Daubner, S. C.; Hillas, P. J. und Fitzpatrick, P. F. (1997): Characterization of chimeric pterin-dependent hydroxylases: contributions of the regulatory domains of tyrosine and phenylalanine hydroxylase to substrate specificity, *Biochemistry.* (Band 36), Nr. 39, Seite 11574-11582.
- Daubner, S. C.; Lohse, D. L. und Fitzpatrick, P. F. (1993): Expression and characterization of catalytic and regulatory domains of rat tyrosine hydroxylase, *Protein Sci.* (Band 2), Nr. 9, Seite 1452-1460.
- Delarue, C.; Becquet, D.; Idres, S.; Hery, F. und Vaudry, H. (1992): Serotonin synthesis in adrenochromaffin cells, *Neuroscience.* (Band 46), Nr. 2, Seite 495-500.
- Delorme, R.; Durand, C. M.; Betancur, C.; Wagner, M.; Ruhrmann, S.; Grabe, H. J.; Nygren, G.; Gillberg, C.; Leboyer, M.; Bourgeron, T.; Courtet, P.; Jollant, F.; Buresi, C.; Aubry, J. M.; Baud, P.; Bondolfi, G.; Bertschy, G.; Perroud, N. und Malafosse, A. (2006): No Human Tryptophan Hydroxylase-2 Gene R441H Mutation in a Large Cohort of Psychiatric Patients and Control Subjects, *Biol.Psychiatry.* (Band 60), Nr. 202, Seite 203.
- Dewhurst, W. G. und Pare, C. M. (1961): A clinical and biochemical study of monoamine oxidase inhibition in depressed patients. II. 5-Hydroxytryptamine tolerance before and after Nialamide, *J.Ment.Sci.* (Band 107:244-9.), Seite 244-249.
- Dickson, P. W.; Jennings, I. G. und Cotton, R. G. (1994): Delineation of the catalytic core of phenylalanine hydroxylase and identification of glutamate 286 as a critical residue for pterin function, *J.Biol.Chem.* (Band 269), Nr. 32, Seite 20369-20375.
- Dumas, S.; Darmon, M. C.; Delort, J. und Mallet, J. (1989): Differential control of tryptophan hydroxylase expression in raphe and in pineal gland: evidence for a role of translation efficiency, *J.Neurosci.Res.* (Band 24), Nr. 4, Seite 537-547.

- Dyck, L. E.; Yang, C. R. und Boulton, A. A. (1983): The biosynthesis of p-tyramine, m-tyramine, and beta-phenylethylamine by rat striatal slices, *J.Neurosci.Res.* (Band 10), Nr. 2, Seite 211-220.
- Eaton, M. J.; Gudehithlu, K. P.; Quach, T.; Silvia, C. P.; Hadjiconstantinou, M. und Neff, N. H. (1993): Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology, *J.Comp Neurol.* (Band 337), Nr. 4, Seite 640-654.
- Elks, M. L.; Youngblood, W. W. und Kizer, J. S. (1979): Serotonin synthesis and release in brain slices: independence of tryptophan, *Brain Res.* (Band 172), Nr. 3, Seite 471-486.
- Fanget, F.; Claustrat, B.; Dalery, J.; Brun, J.; Terra, J. L.; Marie-Cardine, M. und Guyotat, J. (1989): Nocturnal plasma melatonin levels in schizophrenic patients, *Biol.Psychiatry.* (Band 25), Nr. 4, Seite 499-501.
- Feng, G. H.; Bailin, T.; Oh, J. und Spritz, R. A. (1997): Mouse pale ear (ep) is homologous to human Hermansky-Pudlak syndrome and contains a rare 'AT-AC' intron, *Hum.Mol.Genet.* (Band 6), Nr. 5, Seite 793-797.
- Ferguson, S. E.; Olshen, A. B.; Levine, D. A.; Viale, A.; Barakat, R. R. und Boyd, J. (2006): Molecular profiling of endometrial cancers from African-American and Caucasian women, *Gynecol.Oncol.* (Band 101), Nr. 2, Seite 209-213.
- Ferguson, S. E.; Olshen, A. B.; Viale, A.; Barakat, R. R. und Boyd, J. (2005): Stratification of intermediate-risk endometrial cancer patients into groups at high risk or low risk for recurrence based on tumor gene expression profiles, *Clin.Cancer Res.* (Band 11), Nr. 6, Seite 2252-2257.
- Fernstrom, J. D. (1983): Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain, *Physiol Rev.* (Band 63), Nr. 2, Seite 484-546.
- Finocchiaro, L. M.; Arzt, E. S.; Fernandez-Castelo, S.; Criscuolo, M.; Finkielman, S. und Nahmod, V. E. (1988): Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway, *J.Interferon Res.* (Band 8), Nr. 6, Seite 705-716.
- Fratta, W.; Biggio, G.; Mercurio, G.; Di Vittorio, P.; Tagliamonte, A. und Gessa, G. L. (1973): Letter: The effect of D- and L-p-chlorophenylalanine on the metabolism of 5-hydroxytryptamine in brain, *J.Pharm.Pharmacol.* (Band 25), Nr. 11, Seite 908-909.
- Frazer, A. (1997): Pharmacology of antidepressants, *J.Clin.Psychopharmacol.* (Band 17 Suppl 1:2S-18S.), Seite 2S-18S.
- Friedman, P. A.; Kappelman, A. H. und Kaufman, S. (1972): Partial purification and characterization of tryptophan hydroxylase from rabbit hindbrain, *J.Biol.Chem.* (Band 247), Nr. 13, Seite 4165-4173.
- Fritze, J. und Beckmann, H. (1988): [The cholinergic-adrenergic equilibrium hypothesis of affective psychoses], *Fortschr.Neurol.Psychiatr.* (Band 56), Nr. 1, Seite 8-21.
- Frungieri, M. B.; Gonzalez-Calvar, S. I.; Rubio, M.; Ozu, M.; Lustig, L. und Calandra, R. S. (1999): Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition, *Neuroendocrinology.* (Band 69), Nr. 4, Seite 299-308.
- Frungieri, M. B.; Zitta, K.; Pignataro, O. P.; Gonzalez-Calvar, S. I. und Calandra, R. S. (2002): Interactions between testicular serotonergic, catecholaminergic, and corticotropin-releasing hormone systems modulating cAMP and testosterone production in the golden hamster, *Neuroendocrinology.* (Band 76), Nr. 1, Seite 35-46.
- Fujimoto, S.; Ueda, H. und Kagawa, H. (1987): Immunocytochemistry on the localization of 5-hydroxytryptamine in monkey and rabbit taste buds, *Acta Anat.(Basel).* (Band 128), Nr. 1, Seite 80-83.
- Furukawa, Y.; Ikuta, N.; Omata, S.; Yamauchi, T.; Isobe, T. und Ichimura, T. (1993): Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (Band 194), Nr. 1, Seite 144-149.
- Garber, S. L. und Makman, M. H. (1987): Regulation of tryptophan hydroxylase activity by a cyclic AMP-dependent mechanism in rat striatum, *Brain Res.* (Band 427), Nr. 1, Seite 1-10.
- Garriock, H. A.; Allen, J. J.; Delgado, P.; Nahaz, Z.; Kling, M. A.; Carpenter, L.; Burke, M.; Burke, W.; Schwartz, T.; Marangell, L. B.; Husain, M.; Erickson, R. P. und Moreno, F. A. (2005): Lack of association of TPH2 exon XI polymorphisms with major depression and treatment resistance, *Mol.Psychiatry.* (Band 10), Nr. 11, Seite 976-977.
- Gaspar, P.; Cases, O. und Maroteaux, L. (2003): The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics, *Nat.Rev.Neurosci.* (Band 4), Nr. 12, Seite 1002-1012.
- Geba, G. P.; Ptak, W.; Anderson, G. M.; Paliwal, V.; Ratzlaff, R. E.; Levin, J. und Askenase, P. W. (1996): Delayed-type hypersensitivity in mast cell-deficient mice: dependence on platelets for expression of contact sensitivity, *J.Immunol.* (Band 157), Nr. 2, Seite 557-565.

- Glatt, C. E.; Carlson, E.; Taylor, T. R.; Risch, N.; Reus, V. I. und Schaefer, C. A. (2005): Response to Zhang et al. (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45, 11-16, *Neuron*. (Band 48), Nr. 5, Seite 704-705.
- Gooding, C.; Roberts, G. C.; Moreau, G.; Nadal-Ginard, B. und Smith, C. W. (1994): Smooth muscle-specific switching of alpha-tropomyosin mutually exclusive exon selection by specific inhibition of the strong default exon, *EMBO J.* (Band 13), Nr. 16, Seite 3861-3872.
- Goodman, M. und New, A. (2000): Impulsive aggression in borderline personality disorder, *Curr.Psychiatry Rep.* (Band 2), Nr. 1, Seite 56-61.
- Goodwill, K. E.; Sabatier, C.; Marks, C.; Raag, R.; Fitzpatrick, P. F. und Stevens, R. C. (1997): Crystal structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 Å and its implications for inherited neurodegenerative diseases, *Nat.Struct.Biol.* (Band 4), Nr. 7, Seite 578-585.
- Green, C. B. und Besharse, J. C. (1994): Tryptophan hydroxylase expression is regulated by a circadian clock in *Xenopus laevis* retina, *J.Neurochem.* (Band 62), Nr. 6, Seite 2420-2428.
- Grenard, P.; Bates, M. K. und Aeschlimann, D. (2001): Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z, *J.Biol.Chem.* (Band 276), Nr. 35, Seite 33066-33078.
- Grin, W. und Grunberger, W. (1998): A significant correlation between melatonin deficiency and endometrial cancer, *Gynecol.Obstet.Invest.* (Band 45), Nr. 1, Seite 62-65.
- Guilleminault, C.; Cathala, J. P. und Castaigne, P. (1973): Effects of 5-hydroxytryptophan on sleep of a patient with a brain-stem lesion, *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* (Band 34), Nr. 2, Seite 177-184.
- Guilluy, C.; Rolli-Derkinderen, M.; Tharaux, P. L.; Melino, G.; Pacaud, P. und Loirand, G. (2007): Transglutaminase-dependent RhoA activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells, *J.Biol.Chem.* (Band 282), Nr. 5, Seite 2918-2928.
- Guo, W.; Mulligan, G. J.; Wormsley, S. und Helfman, D. M. (1991): Alternative splicing of beta-tropomyosin pre-mRNA: cis-acting elements and cellular factors that block the use of a skeletal muscle exon in nonmuscle cells, *Genes Dev.* (Band 5), Nr. 11, Seite 2096-2107.
- Hall, S. L. und Padgett, R. A. (1994): Conserved sequences in a class of rare eukaryotic nuclear introns with non-consensus splice sites, *J.Mol.Biol.* (Band 239), Nr. 3, Seite 357-365.
- Hall, S. L. und Padgett, R. A. (1996): Requirement of U12 snRNA for in vivo splicing of a minor class of eukaryotic nuclear pre-mRNA introns, *Science*. (Band 271), Nr. 5256, Seite 1716-1718.
- Hamon, M.; Bourgoïn, S.; Artaud, F. und Nelson, D. (1981): Regulatory properties of neuronal tryptophan hydroxylase, *Adv.Exp.Med.Biol.* (Band 133:231-51.), Seite 231-251.
- Hamon, M.; Bourgoïn, S.; Hery, F. und Simonnet, G. (1978): Activation of tryptophan hydroxylase by adenosine triphosphate, magnesium, and calcium, *Mol.Pharmacol.* (Band 14), Nr. 1, Seite 99-110.
- Hansen, M. B. (1995): Serotonin--an intestinal secretagogue--receptor subtypes and intracellular mediators, *Pharmacol.Toxicol.* (Band 77 Suppl 1:3-39.), Seite 3-39.
- Harris, A. L. und Smith, I. E. (1983): Tryptophan in the treatment of carcinoid crisis, *Cancer Chemother.Pharmacol.* (Band 10), Nr. 2, Seite 137-139.
- Hart, R. P.; Yang, R.; Riley, L. A. und Green, T. L. (1991): Post-transcriptional control of tryptophan hydroxylase gene expression in rat brain stem and pineal gland, *Mol.Cell Neurosci.* (Band 2), Seite 71-77.
- Harvey, M.; Shink, E.; Tremblay, M.; Gagne, B.; Raymond, C.; Labbe, M.; Walther, D. J.; Bader, M. und Barden, N. (2004): Support for the involvement of TPH2 gene in affective disorders, *Mol.Psychiatry*. (Band 9), Nr. 11, Seite 980-981.
- Hasegawa, H.; Yanagisawa, M.; Inoue, F.; Yanaihara, N. und Ichiyama, A. (1987): Demonstration of non-neural tryptophan 5-mono-oxygenase in mouse intestinal mucosa, *Biochem.J.* (Band 248), Nr. 2, Seite 501-509.
- Haycock, J. W.; Kumer, S. C.; Lewis, D. A.; Vrana, K. E. und Stockmeier, C. A. (2002): A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope, *J.Neurosci.Methods*. (Band 114), Nr. 2, Seite 205-212.
- Hegedus, T. J.; Falzon, M.; Margaretten, N.; Gazdar, A. F. und Schuller, H. M. (1987): Inhibition of N-diethylnitrosamine metabolism by human lung cancer cell lines with features of well differentiated pulmonary endocrine cells, *Biochem.Pharmacol.* (Band 36), Nr. 20, Seite 3339-3343.

- Higley, J. D. und Linnoila, M. (1997): Low central nervous system serotonergic activity is traitlike and correlates with impulsive behavior. A nonhuman primate model investigating genetic and environmental influences on neurotransmission, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (Band 836:39-56.), Seite 39-56.
- Hodge, M. R. und Cumsy, M. G. (1989): Splicing of a yeast intron containing an unusual 5' junction sequence, *Mol.Cell Biol.* (Band 9), Nr. 6, Seite 2765-2770.
- Hoffman, P. N. und Cleveland, D. W. (1988): Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (Band 85), Nr. 12, Seite 4530-4533.
- Holland, J. M. (1976): Serotonin deficiency and prolonged bleeding in beige mice, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* (Band 151), Nr. 1, Seite 32-39.
- Hoyer, D.; Clarke, D. E.; Fozard, J. R.; Hartig, P. R.; Martin, G. R.; Mylecharane, E. J.; Saxena, P. R. und Humphrey, P. P. (1994): International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin), *Pharmacol.Rev.* (Band 46), Nr. 2, Seite 157-203.
- Hoyer, D.; Hannon, J. P. und Martin, G. R. (2002): Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors, *Pharmacol.Biochem.Behav.* (Band 71), Nr. 4, Seite 533-554.
- Hoyer, D. und Martin, G. (1997): 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome, *Neuropharmacology.* (Band 36), Nr. 4-5, Seite 419-428.
- Hufton, S. E.; Jennings, I. G. und Cotton, R. G. (1995): Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases, *Biochem.J.* (Band 311), Nr. Pt 2, Seite 353-366.
- Huh, G. S. und Hynes, R. O. (1994): Regulation of alternative pre-mRNA splicing by a novel repeated hexanucleotide element, *Genes Dev.* (Band 8), Nr. 13, Seite 1561-1574.
- Huh, S. O.; Park, D. H.; Cho, J. Y.; Joh, T. H. und Son, J. H. (1994): A 6.1 kb 5' upstream region of the mouse tryptophan hydroxylase gene directs expression of *E. coli lacZ* to major serotonergic brain regions and pineal gland in transgenic mice, *Brain Res.Mol.Brain Res.* (Band 24), Nr. 1-4, Seite 145-152.
- Humphrey, P. P.; Hartig, P. und Hoyer, D. (1993): A proposed new nomenclature for 5-HT receptors, *Trends Pharmacol.Sci.* (Band 14), Nr. 6, Seite 233-236.
- Ichimura, T.; Isobe, T.; Okuyama, T.; Takahashi, N.; Araki, K.; Kuwano, R. und Takahashi, Y. (1988): Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (Band 85), Nr. 19, Seite 7084-7088.
- Ichimura, T.; Isobe, T.; Okuyama, T.; Yamauchi, T. und Fujisawa, H. (1987): Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of  $Ca^{2+}$ , calmodulin-dependent protein kinase II, *FEBS Lett.* (Band 219), Nr. 1, Seite 79-82.
- Ishizuka, J.; Beauchamp, R. D.; Townsend, C. M., Jr.; Greeley, G. H., Jr. und Thompson, J. C. (1992): Receptor-mediated autocrine growth-stimulatory effect of 5-hydroxytryptamine on cultured human pancreatic carcinoid cells, *J.Cell Physiol.* (Band 150), Nr. 1, Seite 1-7.
- Isles, A. R.; Hathway, G. J.; Humby, T.; de la, Riva C.; Kendrick, K. M. und Wilkinson, L. S. (2005): An mTph2 SNP gives rise to alterations in extracellular 5-HT levels, but not in performance on a delayed-reinforcement task, *Eur.J.Neurosci.* (Band 22), Nr. 4, Seite 997-1000.
- Jackson, I. J. (1991): A reappraisal of non-consensus mRNA splice sites, *Nucleic Acids Res.* (Band 19), Nr. 14, Seite 3795-3798.
- Jacobs, B. L. und Azmitia, E. C. (1992): Structure and function of the brain serotonin system, *Physiol Rev.* (Band 72), Nr. 1, Seite 165-229.
- Jaeger, C. B.; Ruggiero, D. A.; Albert, V. R.; Park, D. H.; Joh, T. H. und Reis, D. J. (1984): Aromatic L-amino acid decarboxylase in the rat brain: immunocytochemical localization in neurons of the brain stem, *Neuroscience.* (Band 11), Nr. 3, Seite 691-713.
- Jann, M. W. und Kurtz, N. M. (1987): Treatment of panic and phobic disorders, *Clin.Pharm.* (Band 6), Nr. 12, Seite 947-962.
- Janowsky, D. S.; el Yousef, M. K.; Davis, J. M. und Sekerke, H. J. (1972): A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression, *Lancet.* (Band 2), Nr. 7778, Seite 632-635.
- Jarrott, B. und Geffen, L. B. (1972): Rapid axoplasmic transport of tyrosine hydroxylase in relation to other cytoplasmic constituents, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (Band 69), Nr. 11, Seite 3440-3442.
- Jiang, G. C.; Yohrling, G. J.; Schmitt, J. D. und Vrana, K. E. (2000): Identification of substrate orienting and phosphorylation sites within tryptophan hydroxylase using homology-based molecular modeling, *J.Mol.Biol.* (Band 302), Nr. 4, Seite 1005-1017.

- Joh, T. H.; Shikimi, T.; Pickel, V. M. und Reis, D. J. (1975): Brain tryptophan hydroxylase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (Band 72), Nr. 9, Seite 3575-3579.
- Johansen, P. A.; Jennings, I.; Cotton, R. G. und Kuhn, D. M. (1996): Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase by exogenous protein kinase A, *J.Neurochem.* (Band 66), Nr. 2, Seite 817-823.
- Johnston, J. P. (1968): Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue, *Biochem.Pharmacol.* (Band 17), Nr. 7, Seite 1285-1297.
- Jones, B. J. und Blackburn, T. P. (2002): The medical benefit of 5-HT research, *Pharmacol.Biochem.Behav.* (Band 71), Nr. 4, Seite 555-568.
- Juorio, A. V. und Boulton, A. A. (1982): The effect of some precursor amino acids and enzyme inhibitors on the mouse striatal concentration of tyramines and homovanillic acid, *J.Neurochem.* (Band 39), Nr. 3, Seite 859-863.
- Kafkafi, N.; Benjamini, Y.; Sakov, A.; Elmer, G. I. und Golani, I. (2005): Genotype-environment interactions in mouse behavior: a way out of the problem, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (Band 102), Nr. 12, Seite 4619-4624.
- Ke, L.; Qi, Z. Y.; Ping, Y. und Ren, C. Y. (2006): Effect of SNP at position 40237 in exon 7 of the TPH2 gene on susceptibility to suicide, *Brain Res.* (Band 1122), Nr. 1, Seite 24-26.
- Khan, I. A. und Thomas, P. (2001): Disruption of neuroendocrine control of luteinizing hormone secretion by aroclor 1254 involves inhibition of hypothalamic tryptophan hydroxylase activity, *Biol.Reprod.* (Band 64), Nr. 3, Seite 955-964.
- Kitahama, K.; Denoyer, M.; Raynaud, B.; Borri-Voltattorni, C.; Weber, M. und Jouvett, M. (1988): Immunohistochemistry of aromatic L-amino acid decarboxylase in the cat forebrain, *J.Comp Neurol.* (Band 270), Nr. 3, Seite 337-353.
- Klein, D. C.; Coon, S. L.; Roseboom, P. H.; Weller, J. L.; Bernard, M.; Gastel, J. A.; Zatz, M.; Iuvone, P. M.; Rodriguez, I. R.; Begay, V.; Falcon, J.; Cahill, G. M.; Cassone, V. M. und Baler, R. (1997): The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland, *Recent Prog.Horm.Res.* (Band 52:307-57; discussion 357-8.), Seite 307-357.
- Klein, D. C. und Weller, J. L. (1970): Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase, *Science.* (Band 169), Nr. 950, Seite 1093-1095.
- Kohrman, D. C.; Harris, J. B. und Meisler, M. H. (1996): Mutation detection in the med and medJ alleles of the sodium channel Scn8a. Unusual splicing due to a minor class AT-AC intron, *J.Biol.Chem.* (Band 271), Nr. 29, Seite 17576-17581.
- Kolossova, I. und Padgett, R. A. (1997): U11 snRNA interacts in vivo with the 5' splice site of U12-dependent (AU-AC) pre-mRNA introns, *RNA.* (Band 3), Nr. 3, Seite 227-233.
- Kos-Kudla, B.; Ostrowska, Z.; Kozlowski, A.; Marek, B.; Ciesielska-Kopacz, N.; Kudla, M.; Kajdaniuk, D.; Strzelczyk, J. und Staszewicz, P. (2002): Circadian rhythm of melatonin in patients with colorectal carcinoma, *Neuro.Endocrinol.Lett.* (Band 23), Nr. 3, Seite 239-242.
- Kuhn, D. M.; Arthur, R., Jr. und States, J. C. (1997): Phosphorylation and activation of brain tryptophan hydroxylase: identification of serine-58 as a substrate site for protein kinase A, *J.Neurochem.* (Band 68), Nr. 5, Seite 2220-2223.
- Kuhn, D. M.; Meyer, M. A. und Lovenberg, W. (1980a): Comparisons of tryptophan hydroxylase from a malignant murine mast cell tumor and rat mesencephalic tegmentum, *Arch.Biochem.Biophys.* (Band 199), Nr. 2, Seite 355-361.
- Kuhn, D. M.; O'Callaghan, J. P.; Juskevich, J. und Lovenberg, W. (1980b): Activation of brain tryptophan hydroxylase by ATP-MG2+: dependence on calmodulin, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (Band 77), Nr. 8, Seite 4688-4691.
- Kuhn, D. M.; O'Callaghan, J. P. und Lovenberg, W. (1980c): The role of calmodulin in the activation of tryptophan hydroxylase by phosphorylating conditions, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (Band 356:399.), Seite 399.
- Kuhn, D. M.; Vogel, R. L. und Lovenberg, W. (1978): Calcium-dependent activation of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (Band 82), Nr. 2, Seite 759-766.
- Kulikov, A. V.; Osipova, D. V.; Naumenko, V. S. und Popova, N. K. (2005a): Association between Tph2 gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains, *Genes Brain Behav.* (Band 4), Nr. 8, Seite 482-485.
- Kulikov, A. V.; Osipova, D. V.; Naumenko, V. S. und Popova, N. K. (2005b): The C1473G polymorphism in the tryptophan hydroxylase-2 gene and intermale aggression in mice, *Dokl.Biol.Sci.* (Band 402:208-10.), Seite 208-210.



- Kumer, S. C.; Mockus, S. M.; Rucker, P. J. und Vrana, K. E. (1997): Amino-terminal analysis of tryptophan hydroxylase: protein kinase phosphorylation occurs at serine-58, *J.Neurochem.* (Band 69), Nr. 4, Seite 1738-1745.
- Lapin, I. P. und Oxenkrug, G. F. (1969): Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect, *Lancet.* (Band 1), Nr. 7586, Seite 132-136.
- Leathwood, P. D. (1987): Tryptophan availability and serotonin synthesis, *Proc.Nutr.Soc.* (Band 46), Nr. 1, Seite 143-156.
- Leibowitz, S. F. und Alexander, J. T. (1998): Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight, *Biol.Psychiatry.* (Band 44), Nr. 9, Seite 851-864.
- Lesch, K. P. und Beckmann, H. (1990): [The serotonin hypothesis of depression], *Fortschr.Neurol.Psychiatr.* (Band 58), Nr. 11, Seite 427-438.
- Lesurtel, M.; Graf, R.; Aleil, B.; Walther, D. J.; Tian, Y.; Jochum, W.; Gachet, C.; Bader, M. und Clavien, P. A. (2006): Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration, *Science.* (Band 312), Nr. 5770, Seite 104-107.
- Levin, M. (2004): A novel immunohistochemical method for evaluation of antibody specificity and detection of labile targets in biological tissue, *J.Biochem.Biophys.Methods.* (Band 58), Nr. 1, Seite 85-96.
- Lipton, R. B.; Scher, A. I.; Kolodner, K.; Liberman, J.; Steiner, T. J. und Stewart, W. F. (2002): Migraine in the United States: epidemiology and patterns of health care use, *Neurology.* (Band 58), Nr. 6, Seite 885-894.
- Lissoni, P.; Rovelli, F.; Malugani, F.; Bucovec, R.; Conti, A. und Maestroni, G. J. (2001): Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients, *Neuro.Endocrinol.Lett.* (Band 22), Nr. 1, Seite 45-47.
- Lohse, D. L. und Fitzpatrick, P. F. (1993): Identification of the intersubunit binding region in rat tyrosine hydroxylase, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (Band 197), Nr. 3, Seite 1543-1548.
- Lovenberg, W. und Victor, S. J. (1974): Regulation of tryptophan and tyrosine hydroxylase, *Life Sci.* (Band 14), Nr. 12, Seite 2337-2353.
- Lucki, I. (1998): The spectrum of behaviors influenced by serotonin, *Biol.Psychiatry.* (Band 44), Nr. 3, Seite 151-162.
- Lucki, I.; Dalvi, A. und Mayorga, A. J. (2001): Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice, *Psychopharmacology (Berl).* (Band 155), Nr. 3, Seite 315-322.
- Mach, T. (2004): The brain-gut axis in irritable bowel syndrome--clinical aspects, *Med.Sci.Monit.* (Band 10), Nr. 6, Seite RA125-RA131.
- Magnussen, I. und Nielsen-Kudsk, F. (1980): Bioavailability and related pharmacokinetics in man of orally administered L-5-hydroxytryptophan in steady state, *Acta Pharmacol.Toxicol.(Copenh).* (Band 46), Nr. 4, Seite 257-262.
- Makita, Y.; Okuno, S. und Fujisawa, H. (1990): Involvement of activator protein in the activation of tryptophan hydroxylase by cAMP-dependent protein kinase, *FEBS Lett.* (Band 268), Nr. 1, Seite 185-188.
- Mandera, M. (2003): [Usefulness of melatonin in the diagnostics and therapy of pineal gland and brain neoplasms], *Wiad.Lek.* (Band 56), Nr. 11-12, Seite 569-573.
- Marsden, C. A.; Conti, J.; Strobe, E.; Curzon, G. und Adams, R. N. (1979): Monitoring 5-hydroxytryptamine release in the brain of the freely moving unanaesthetized rat using in vivo voltammetry, *Brain Res.* (Band 171), Nr. 1, Seite 85-99.
- Martinez, A.; Knappskog, P. M. und Haavik, J. (2001): A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis, *Curr.Med.Chem.* (Band 8), Nr. 9, Seite 1077-1091.
- Matsuda, M.; Imaoka, T.; Vomachka, A. J.; Gudelsky, G. A.; Hou, Z.; Mistry, M.; Bailey, J. P.; Nieport, K. M.; Walther, D. J.; Bader, M. und Horseman, N. D. (2004): Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop, *Dev.Cell.* (Band 6), Nr. 2, Seite 193-203.
- McKinney, J.; Knappskog, P. M. und Haavik, J. (2005): Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase, *J.Neurochem.* (Band 92), Nr. 2, Seite 311-320.
- McKinney, J.; Teigen, K.; Froystein, N. A.; Salaun, C.; Knappskog, P. M.; Haavik, J. und Martinez, A. (2001): Conformation of the substrate and pterin cofactor bound to human tryptophan hydroxylase. Important role of Phe313 in substrate specificity, *Biochemistry.* (Band 40), Nr. 51, Seite 15591-15601.
- Mockus, S. M.; Kumer, S. C. und Vrana, K. E. (1997): Carboxyl terminal deletion analysis of tryptophan hydroxylase, *Biochim.Biophys.Acta.* (Band 1342), Nr. 2, Seite 132-140.

- Mockus, S. M. und Vrana, K. E. (1998): Advances in the molecular characterization of tryptophan hydroxylase, *J.Mol.Neurosci.* (Band 10), Nr. 3, Seite 163-179.
- Molliver, M. E. (1987): Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function, *J.Clin.Psychopharmacol.* (Band 7), Nr. 6 Suppl, Seite 3S-23S.
- Muchardt, C.; Sardet, C.; Bourachot, B.; Onufryk, C. und Yaniv, M. (1995): A human protein with homology to *Saccharomyces cerevisiae* SNF5 interacts with the potential helicase hbrm, *Nucleic Acids Res.* (Band 23), Nr. 7, Seite 1127-1132.
- Murphy, D. L.; Mueller, E. A.; Garrick, N. A. und Aulakh, C. S. (1986): Use of serotonergic agents in the clinical assessment of central serotonin function, *J.Clin.Psychiatry.* (Band 47 Suppl:9-15.), Seite 9-15.
- Murphy, D. L.; Zohar, J.; Benkelfat, C.; Pato, M. T.; Pigott, T. A. und Insel, T. R. (1989): Obsessive-compulsive disorder as a 5-HT subsystem-related behavioural disorder, *Br.J.Psychiatry Suppl.*, Nr. 8, Seite 15-24.
- Mutter, G. L.; Baak, J. P.; Fitzgerald, J. T.; Gray, R.; Neuberg, D.; Kust, G. A.; Gentleman, R.; Gullans, S. R.; Wei, L. J. und Wilcox, M. (2001): Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation, *Gynecol.Oncol.* (Band 83), Nr. 2, Seite 177-185.
- Nakamura, K.; Sugawara, Y.; Sawabe, K.; Ohashi, A.; Tsurui, H.; Xiu, Y.; Ohtsuji, M.; Lin, Q. S.; Nishimura, H.; Hasegawa, H. und Hirose, S. (2006): Late developmental stage-specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels, *J.Neurosci.* (Band 26), Nr. 2, Seite 530-534.
- Nakata, H. und Fujisawa, H. (1982a): Purification and properties of tryptophan 5-monoxygenase from rat brain-stem, *Eur.J.Biochem.* (Band 122), Nr. 1, Seite 41-47.
- Nakata, H. und Fujisawa, H. (1982b): Tryptophan 5-monoxygenase from mouse mastocytoma P815. A simple purification and general properties, *Eur.J.Biochem.* (Band 124), Nr. 3, Seite 595-601.
- Nakata, T.; Terada, S. und Hirokawa, N. (1998): Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons, *J.Cell Biol.* (Band 140), Nr. 3, Seite 659-674.
- Nangaku, M.; Sato-Yoshitake, R.; Okada, Y.; Noda, Y.; Takemura, R.; Yamazaki, H. und Hirokawa, N. (1994): KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria, *Cell.* (Band 79), Nr. 7, Seite 1209-1220.
- Nestler, E. J.; Barrot, M.; DiLeone, R. J.; Eisch, A. J.; Gold, S. J. und Monteggia, L. M. (2002): Neurobiology of depression, *Neuron.* (Band 34), Nr. 1, Seite 13-25.
- Newman, C.; Wang, D. und Cutz, E. (1993): Serotonin (5-hydroxytryptamine) expression in pulmonary neuroendocrine cells (NE) and a netumor cell line, *Adv.Exp.Med.Biol.* (Band 337), Seite 73-78.
- Nonogaki, K.; Strack, A. M.; Dallman, M. F. und Tecott, L. H. (1998): Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene, *Nat.Med.* (Band 4), Nr. 10, Seite 1152-1156.
- O'Kane, R. L.; Vina, J. R.; Simpson, I. und Hawkins, R. A. (2004): Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporters A, ASC, and N of the blood-brain barrier: mechanisms for neutral amino acid removal, *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* (Band 287), Nr. 4, Seite E622-E629.
- O'leary, O. F.; Bechtholt, A. J.; Crowley, J. J.; Hill, T. E.; Page, M. E. und Lucki, I. (2007): Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test, *Psychopharmacology (Berl.)* (Band 192), Nr. 3 Seite 357-371.
- Oaknin-Bendahan, S.; Anis, Y.; Nir, I. und Zisapel, N. (1995): Effects of long-term administration of melatonin and a putative antagonist on the ageing rat, *Neuroreport.* (Band 6), Nr. 5, Seite 785-788.
- Ormsbee, H. S., III und Fondacaro, J. D. (1985): Action of serotonin on the gastrointestinal tract, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* (Band 178), Nr. 3, Seite 333-338.
- Park, D. H.; Stone, D. M.; Kim, K. S. und Joh, T. H. (1994): Characterization of recombinant mouse tryptophan hydroxylase expressed in *Escherichia coli*, *Mol.Cell Neurosci.* (Band 5), Nr. 1, Seite 87-93.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. E. und Briley, M. (1985): Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *J.Neurosci.Methods.* (Band 14), Nr. 3, Seite 149-167.
- Perrault, G.; Morel, E.; Zivkovic, B. und Sanger, D. J. (1992): Activity of litoxetine and other serotonin uptake inhibitors in the tail suspension test in mice, *Pharmacol.Biochem.Behav.* (Band 42), Nr. 1, Seite 45-47.
- Persson, T. und Roos, B. E. (1967): 5-hydroxytryptophan for depression, *Lancet.* (Band 2), Nr. 7523, Seite 987-988.

- Pevet, P.; Bothorel, B.; Sloten, H. und Saboureau, M. (2002): The chronobiotic properties of melatonin, *Cell Tissue Res.* (Band 309), Nr. 1, Seite 183-191.
- Pickel, V. M.; Joh, T. H. und Reis, D. J. (1975a): Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in brain by light and electron microscopy, *Brain Res.* (Band 85), Nr. 2, Seite 295-300.
- Pickel, V. M.; Joh, T. H. und Reis, D. J. (1975b): Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in noradrenergic neurons of brain, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (Band 72), Nr. 2, Seite 659-663.
- Porsolt, R. D.; Anton, G.; Blavet, N. und Jalfre, M. (1978): Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments, *Eur.J.Pharmacol.* (Band 47), Nr. 4, Seite 379-391.
- Porsolt, R. D.; Le Pichon, M. und Jalfre, M. (1977): Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments, *Nature.* (Band 266), Nr. 5604, Seite 730-732.
- Prange, A. J., Jr. (1964): The pharmacology and biochemistry of depression, *Dis.Nerv.Syst.* (Band 25:217-21.), Seite 217-221.
- Qin, L.; Wang, X.; Duan, Q.; Chen, B. und He, S. (2004): Inhibitory effect of melatonin on the growth of H22 hepatocarcinoma cells by inducing apoptosis, *J.Huazhong.Univ.Sci.Technolog.Med.Sci.* (Band 24), Nr. 1, Seite 19-21, 31.
- Rapport, M. M.; Green, A. A. und PAGE, I. H. (1947): Purification of the substance which is responsible for the vasoconstrictor activity of serum, *Fed.Proc.* (Band 6), Seite 184-184.
- Rapport, M. M.; Green, A. A. und PAGE, I. H. (1948): Serum vasoconstrictor (serotonin). III. Chemical inactivation, *J.Biol.Chem.* (Band 176), Seite 1237-1237.
- Rapport, M. M.; Green, A. A. und PAGE, I. H. (2006): Purification of the substance which is responsible for the vasoconstrictor activity of serum, *Fed.Proc.* (Band 6), Seite 184-184.
- Raymond, J. R.; Mukhin, Y. V.; Gelasco, A.; Turner, J.; Collinworth, G.; Gettys, T. W.; Grewal, J. S. und Garnovskaya, M. N. (2001): Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction, *Pharmacol.Ther.* (Band 92), Nr. 2-3, Seite 179-212.
- Reed, R. und Maniatis, T. (1986): A role for exon sequences and splice-site proximity in splice-site selection, *Cell.* (Band 46), Nr. 5, Seite 681-690.
- Reiter, R. J. (1993): The melatonin rhythm: both a clock and a calendar, *Experientia.* (Band 49), Nr. 8, Seite 654-664.
- Richerson, G. B. (2004): Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis, *Nat.Rev.Neurosci.* (Band 5), Nr. 6, Seite 449-461.
- Riederer, P.; Beckmann, H. und Brucke, T. (1985): [Current biochemical hypotheses of endogenous depression], *Wien.Klin.Wochenschr.* (Band 97), Nr. 4, Seite 190-196.
- Rosa-Neto, P.; Diksic, M.; Okazawa, H.; Leyton, M.; Ghadirian, N.; Mzengeza, S.; Nakai, A.; Debonnel, G.; Blier, P. und Benkelfat, C. (2004): Measurement of brain regional alpha-[11C]methyl-L-tryptophan trapping as a measure of serotonin synthesis in medication-free patients with major depression, *Arch.Gen.Psychiatry.* (Band 61), Nr. 6, Seite 556-563.
- Roseboom, P. H.; Coon, S. L.; Baler, R.; McCune, S. K.; Weller, J. L. und Klein, D. C. (1996): Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland, *Endocrinology.* (Band 137), Nr. 7, Seite 3033-3045.
- Ryan, K. J. und Cooper, T. A. (1996): Muscle-specific splicing enhancers regulate inclusion of the cardiac troponin T alternative exon in embryonic skeletal muscle, *Mol.Cell Biol.* (Band 16), Nr. 8, Seite 4014-4023.
- Sainz, R. M.; Mayo, J. C.; Tan, D. X.; Leon, J.; Manchester, L. und Reiter, R. J. (2005): Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism, *Prostate.* (Band 63), Nr. 1, Seite 29-43.
- Sakowski, S. A.; Geddes, T. J. und Kuhn, D. M. (2006a): Mouse tryptophan hydroxylase isoform 2 and the role of proline 447 in enzyme function, *J.Neurochem.* (Band 96), Nr. 3, Seite 758-765.
- Sakowski, S. A.; Geddes, T. J.; Thomas, D. M.; Levi, E.; Hatfield, J. S. und Kuhn, D. M. (2006b): Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies, *Brain Res.* (Band 1085), Nr. 1, Seite 11-18.
- Salter, M.; Knowles, R. G. und Pogson, C. I. (1989): How does displacement of albumin-bound tryptophan cause sustained increases in the free tryptophan concentration in plasma and 5-hydroxytryptamine synthesis in brain?, *Biochem.J.* (Band 262), Nr. 1, Seite 365-368.
- Santoso, D. I.; Rogers, P.; Wallace, E. M.; Manuelpillai, U.; Walker, D. und Subakir, S. B. (2002): Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase and 4-hydroxynonenal in normal and pre-eclamptic placentae, *Placenta.* (Band 23), Nr. 5, Seite 373-379.

- Schaechter, J. D. und Wurtman, R. J. (1989): Tryptophan availability modulates serotonin release from rat hypothalamic slices, *J.Neurochem.* (Band 53), Nr. 6, Seite 1925-1933.
- Schernhammer, E. S.; Holly, J. M.; Hunter, D. J.; Pollak, M. N. und Hankinson, S. E. (2006): Insulin-like growth factor-I, its binding proteins (IGFBP-1 and IGFBP-3), and growth hormone and breast cancer risk in The Nurses Health Study II, *Endocr.Relat Cancer.* (Band 13), Nr. 2, Seite 583-592.
- Schikowski, A.; Thewissen, M.; Mathis, C.; Ross, H. G. und Enck, P. (2002): Serotonin type-4 receptors modulate the sensitivity of intramural mechanoreceptive afferents of the cat rectum, *Neurogastroenterol.Motil.* (Band 14), Nr. 3, Seite 221-227.
- Schildkraut, J. J. (1965): The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence, *Am.J.Psychiatry.* (Band 122), Nr. 5, Seite 509-522.
- Shapiro, M. B. und Senapathy, P. (1987): RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression, *Nucleic Acids Res.* (Band 15), Nr. 17, Seite 7155-7174.
- Sharp, T.; Bramwell, S. R. und Grahame-Smith, D. G. (1992): Effect of acute administration of L-tryptophan on the release of 5-HT in rat hippocampus in relation to serotonergic neuronal activity: an in vivo microdialysis study, *Life Sci.* (Band 50), Nr. 17, Seite 1215-1223.
- Sheehan, K.; Lowe, N.; Kirley, A.; Mullins, C.; Fitzgerald, M.; Gill, M. und Hawi, Z. (2005): Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene variants associated with ADHD, *Mol.Psychiatry.* (Band 10), Nr. 10, Seite 944-949.
- Shulkin, B. L.; Betz, A. L.; Koeppe, R. A. und Agranoff, B. W. (1995): Inhibition of neutral amino acid transport across the human blood-brain barrier by phenylalanine, *J.Neurochem.* (Band 64), Nr. 3, Seite 1252-1257.
- Skagerberg, G.; Meister, B.; Hokfelt, T.; Lindvall, O.; Goldstein, M.; Joh, T. und Cuellar, A. C. (1988): Studies on dopamine-, tyrosine hydroxylase- and aromatic L-amino acid decarboxylase-containing cells in the rat diencephalon: comparison between formaldehyde-induced histofluorescence and immunofluorescence, *Neuroscience.* (Band 24), Nr. 2, Seite 605-620.
- Sole, M. J.; Madapallimattam, A. und Baines, A. D. (1986): An active pathway for serotonin synthesis by renal proximal tubules, *Kidney Int.* (Band 29), Nr. 3, Seite 689-694.
- Son, J. H.; Chung, J. H.; Huh, S. O.; Park, D. H.; Peng, C.; Rosenblum, M. G.; Chung, Y. I. und Joh, T. H. (1996): immortalization of neuroendocrine pinealocytes from transgenic mice by targeted tumorigenesis using the tryptophan hydroxylase promoter, *Brain Res.Mol.Brain Res.* (Band 37), Nr. 1-2, Seite 32-40.
- Sourkes, T. L. (1979): DOPA decarboxylase (aromatic amino acid decarboxylase)., Horn, A. S.; Korf, J. und Westerink, B. H. C., *The Neurobiology of Dopamine*, Seite 123-132, Academic Press.
- Stelzl, U.; Worm, U.; Lalowski, M.; Haenig, C.; Brembeck, F. H.; Goehler, H.; Stroedicke, M.; Zenkner, M.; Schoenherr, A.; Koeppen, S.; Timm, J.; Mintzlaff, S.; Abraham, C.; Bock, N.; Kietzmann, S.; Goedde, A.; Toksoz, E.; Droege, A.; Krobitsch, S.; Korn, B.; Birchmeier, W.; Lehrach, H. und Wanker, E. E. (2005): A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome, *Cell.* (Band 122), Nr. 6, Seite 957-968.
- Steru, L.; Chermat, R.; Thierry, B. und Simon, P. (1985): The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice, *Psychopharmacology (Berl).* (Band 85), Nr. 3, Seite 367-370.
- Tamarkin, L.; Baird, C. J. und Almeida, O. F. (1985): Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction?, *Science.* (Band 227), Nr. 4688, Seite 714-720.
- Tan, D. X.; Manchester, L. C.; Reiter, R. J.; Qi, W. B.; Zhang, M.; Weintraub, S. T.; Cabrera, J.; Sainz, R. M. und Mayo, J. C. (1999): Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance, *Biochim.Biophys.Acta.* (Band 1472), Nr. 1-2, Seite 206-214.
- Tanaka, Y.; Kanai, Y.; Okada, Y.; Nonaka, S.; Takeda, S.; Harada, A. und Hirokawa, N. (1998): Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria, *Cell.* (Band 93), Nr. 7, Seite 1147-1158.
- TWAROG, B. M. und PAGE, I. H. (1953): Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination, *Am.J.Physiol.* (Band 175), Nr. 1, Seite 157-161.
- Van Den, Bogaert A.; De Zutter, S.; Heyrman, L.; Mendlewicz, J.; Adolfsson, R.; Van Broeckhoven, C. und Del Favero, J. (2005): Response to Zhang et al (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major Depression. *Neuron* 45, 11-16, *Neuron.* (Band 48), Nr. 5, Seite 704-706.

- Van Den, Bogaert A.; Slegers, K.; De Zutter, S.; Heyrman, L.; Norrback, K. F.; Adolfsson, R.; Van Broeckhoven, C. und Del Favero, J. (2006): Association of brain-specific tryptophan hydroxylase, TPH2, with unipolar and bipolar disorder in a Northern Swedish, isolated population, *Arch.Gen.Psychiatry*. (Band 63), Nr. 10, Seite 1103-1110.
- Villalon, C. M.; Centurion, D.; Valdivia, L. F.; de Vries, P. und Saxena, P. R. (2003): Migraine: pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends, *Curr.Vasc.Pharmacol.* (Band 1), Nr. 1, Seite 71-84.
- Voltattorni, C. B.; Giartosio, A. und Turano, C. (1987): Aromatic-L-amino acid decarboxylase from pig kidney, *Methods Enzymol.* (Band 142:179-87.), Seite 179-187.
- Voog, L. und Eriksson, T. (1992): Is rat brain content of large neutral amino acids (LNAAs) a reflection of plasma LNA concentrations?, *J.Neural Transm.Gen.Sect.* (Band 87), Nr. 2, Seite 133-143.
- Vrana, K. E.; Walker, S. J.; Rucker, P. und Liu, X. (1994): A carboxyl terminal leucine zipper is required for tyrosine hydroxylase tetramer formation, *J.Neurochem.* (Band 63), Nr. 6, Seite 2014-2020.
- Wahlsten, D.; Metten, P.; Phillips, T. J.; Boehm, S. L.; Burkhart-Kasch, S.; Dorow, J.; Doerksen, S.; Downing, C.; Fogarty, J.; Rodd-Henricks, K.; Hen, R.; McKinnon, C. S.; Merrill, C. M.; Nolte, C.; Schalomon, M.; Schlumbohm, J. P.; Sibert, J. R.; Wenger, C. D.; Dudek, B. C. und Crabbe, J. C. (2003): Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction, *J.Neurobiol.* (Band 54), Nr. 1, Seite 283-311.
- Walker, S. J.; Liu, X.; Roskoski, R. und Vrana, K. E. (1994): Catalytic core of rat tyrosine hydroxylase: terminal deletion analysis of bacterially expressed enzyme, *Biochim.Biophys.Acta.* (Band 1206), Nr. 1, Seite 113-119.
- Walther, D. J. und Bader, M. (1999): Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells, *Brain Res.Mol.Brain Res.* (Band 68), Nr. 1-2, Seite 55-63.
- Walther, D. J. und Bader, M. (2003): A unique central tryptophan hydroxylase isoform, *Biochem.Pharmacol.* (Band 66), Nr. 9, Seite 1673-1680.
- Walther, D. J.; Peter, J. U. und Bader, M. (2002): 7-Hydroxytryptophan, a novel, specific, cytotoxic agent for carcinoids and other serotonin-producing tumors, *Cancer.* (Band 94), Nr. 12, Seite 3135-3140.
- Walther, D. J.; Peter, J. U.; Bashammakh, S.; Hortnagl, H.; Voits, M.; Fink, H. und Bader, M. (2003a): Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform, *Science.* (Band 299), Nr. 5603, Seite 76.
- Walther, D. J.; Peter, J. U.; Winter, S.; Holtje, M.; Paulmann, N.; Grohmann, M.; Vowinkel, J.; Alamo-Bethencourt, V.; Wilhelm, C. S.; Ahnert-Hilger, G. und Bader, M. (2003b): Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release, *Cell.* (Band 115), Nr. 7, Seite 851-862.
- Wang, L. und Brown, A. (2002): Rapid movement of microtubules in axons, *Curr.Biol.* (Band 12), Nr. 17, Seite 1496-1501.
- Wang, L.; Erlandsen, H.; Haavik, J.; Knappskog, P. M. und Stevens, R. C. (2002): Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin, *Biochemistry.* (Band 41), Nr. 42, Seite 12569-12574.
- Wang, W.; Cote, J.; Xue, Y.; Zhou, S.; Khavari, P. A.; Biggar, S. R.; Muchardt, C.; Kalpana, G. V.; Goff, S. P.; Yaniv, M.; Workman, J. L. und Crabtree, G. R. (1996): Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex, *EMBO J.* (Band 15), Nr. 19, Seite 5370-5382.
- Weber, L. J. und Horita, A. (1965): A study of 5-hydroxytryptamine formation from L-tryptophan in the brain and other tissues, *Biochem.Pharmacol.* (Band 14), Nr. 7, Seite 1141-1149.
- Weiner, C. P. (1987): The role of serotonin in the genesis of hypertension in preeclampsia, *Am.J.Obstet.Gynecol.* (Band 156), Nr. 4, Seite 885-888.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (2001): Serotonin and brain development: role in human developmental diseases, *Brain Res.Bull.* (Band 56), Nr. 5, Seite 479-485.
- Wieringa, B.; Meyer, F.; Reiser, J. und Weissmann, C. (1983): Unusual splice sites revealed by mutagenic inactivation of an authentic splice site of the rabbit beta-globin gene, *Nature.* (Band 301), Nr. 5895, Seite 38-43.
- Winchel, R. M. und Stanley, M. (1991): Self-injurious behavior: a review of the behavior and biology of self-mutilation, *Am.J.Psychiatry.* (Band 148), Nr. 3, Seite 306-317.
- Wong, Y. F.; Cheung, T. H.; Lo, K. W.; Yim, S. F.; Siu, N. S.; Chan, S. C.; Ho, T. W.; Wong, K. W.; Yu, M. Y.; Wang, V. W.; Li, C.; Gardner, G. J.; Bonome, T.; Johnson, W. B.; Smith, D. I.; Chung, T. K. und

- Birrer, M. J. (2006): Identification of molecular markers and signaling pathway in endometrial cancer in Hong Kong Chinese women by genome-wide gene expression profiling, *Oncogene*. (Band .).
- Wu, Q. und Krainer, A. R. (1996): U1-mediated exon definition interactions between AT-AC and GT-AG introns, *Science*. (Band 274), Nr. 5289, Seite 1005-1008.
- Wu, Q. und Krainer, A. R. (1997): Splicing of a divergent subclass of AT-AC introns requires the major spliceosomal snRNAs, *RNA*. (Band 3), Nr. 6, Seite 586-601.
- Wu, Q. und Krainer, A. R. (1998): Purine-rich enhancers function in the AT-AC pre-mRNA splicing pathway and do so independently of intact U1 snRNP, *RNA*. (Band 4), Nr. 12, Seite 1664-1673.
- Wyatt, R. J.; Zarcone, V.; Engelman, K.; Dement, W. C.; Snyder, F. und Sjoerdsma, A. (1971): Effects of 5-hydroxytryptophan on the sleep of normal human subjects, *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol*. (Band 30), Nr. 6, Seite 505-509.
- Xue, J. und Rask, L. (1995): The unusual 5' splicing border GC is used in myrosinase genes of the Brassicaceae, *Plant Mol.Biol*. (Band 29), Nr. 1, Seite 167-171.
- Yamaguchi, T.; Sawada, M.; Kato, T. und Nagatsu, T. (1981): Demonstration of tryptophan 5-monooxygenase activity in human brain by high sensitive high-performance liquid chromatography with fluorometric detection, *Biochem.Int*. (Band 2), Seite 295-303.
- Yamauchi, T. und Fujisawa, H. (1979a): Activation of tryptophan 5-monooxygenase by calcium-dependent regulator protein, *Biochem.Biophys.Res.Comm*. (Band 90), Nr. 1, Seite 28-35.
- Yamauchi, T. und Fujisawa, H. (1979b): Regulation of rat brainstem tryptophan 5-monooxygenase. Calcium-dependent reversible activation by ATP and magnesium, *Arch.Biochem.Biophys*. (Band 198), Nr. 1, Seite 219-226.
- Yamauchi, T. und Fujisawa, H. (1983): Purification and characterization of the brain calmodulin-dependent protein kinase (kinase II), which is involved in the activation of tryptophan 5-monooxygenase, *Eur.J.Biochem*. (Band 132), Nr. 1, Seite 15-21.
- Yamauchi, T.; Nakata, H. und Fujisawa, H. (1981): A new activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ -, calmodulin-dependent protein kinase. Purification and characterization, *J.Biol.Chem*. (Band 256), Nr. 11, Seite 5404-5409.
- Yang, X. J. und Kaufman, S. (1994): High-level expression and deletion mutagenesis of human tryptophan hydroxylase, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. (Band 91), Nr. 14, Seite 6659-6663.
- Yohrling IV, G. J.; Jiang, G. C.; DeJohn, M. M.; Robertson, D. J.; Vrana, K. E. und Cha, J. H. (2002): Inhibition of tryptophan hydroxylase activity and decreased 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in a mouse model of Huntington's disease, *J.Neurochem*. (Band 82), Nr. 6, Seite 1416-1423.
- Yonekawa, Y.; Harada, A.; Okada, Y.; Funakoshi, T.; Kanai, Y.; Takei, Y.; Terada, S.; Noda, T. und Hirokawa, N. (1998): Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice, *J.Cell Biol*. (Band 20;141), Nr. 2, Seite 431-441.
- Young, M. R.; Kut, J. L.; Coogan, M. P.; Wright, M. A.; Young, M. E. und Matthews, J. (1993): Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin, *Immunology*. (Band 80), Nr. 3, Seite 395-400.
- Yu, Y. T. und Steitz, J. A. (1997): Site-specific crosslinking of mammalian U11 and u6atac to the 5' splice site of an AT-AC intron, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. (Band 94), Nr. 12, Seite 6030-6035.
- Zhang, X.; Beaulieu, J. M.; Sotnikova, T. D.; Gainetdinov, R. R. und Caron, M. G. (2004): Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis, *Science*. (Band 305), Nr. 5681, Seite 217.
- Zhang, X.; Gainetdinov, R. R.; Beaulieu, J. M.; Sotnikova, T. D.; Burch, L. H.; Williams, R. B.; Schwartz, D. A.; Krishnan, K. R. und Caron, M. G. (2005): Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression, *Neuron*. (Band 45), Nr. 1, Seite 11-16.
- Zhou, Q. Y.; Quaife, C. J. und Palmiter, R. D. (1995): Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development, *Nature*. (Band 374), Nr. 6523, Seite 640-643.
- Zhou, Z.; Peters, E. J.; Hamilton, S. P.; McMahon, F.; Thomas, C.; McGrath, P. J.; Rush, J.; Trivedi, M. H.; Charney, D. S.; Roy, A.; Wisniewski, S.; Lipsky, R. und Goldman, D. (2005): Response to Zhang et al. (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45, 11-16, *Neuron*. (Band 48), Nr. 5, Seite 702-703.
- Zill, P.; Baghai, T. C.; Zwanzger, P.; Schule, C.; Eser, D.; Rupprecht, R.; Moller, H. J.; Bondy, B. und Ackenheil, M. (2004a): SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression, *Mol.Psychiatry*. (Band 9), Nr. 11, Seite 1030-1036.

Zill, P.; Buttner, A.; Eisenmenger, W.; Moller, H. J.; Bondy, B. und Ackenheil, M. (2004b): Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims, *Biol.Psychiatry*. (Band 56), Nr. 8, Seite 581-586.

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Prof. Michael Bader für die Möglichkeit und die Mittel, meine Promotionsarbeit in seiner Gruppe anfertigen zu können, und für seine stets verfügbare, geduldige und anregende Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Prof. Wolfgang Lockau gilt mein Dank für die Übernahme der universitären Betreuung meiner Dissertation.

Für die exzellente technische Assistenz und die Betreuung der Versuchstiere bedanke ich mich herzlich bei Monika Nitz, Marleen Klann, Adelheid Böttger, Cathrin Rudolph und Sabine Grüger.

Eine große und unverzichtbare Hilfe bei wissenschaftlichen Fragestellungen waren für mich Dr. Claudia Wilhelm, Dr. Fatimunnisa Qadri, Dr. Lilian Gutu, Dr. Mihail Todiras, Dr. Jörg-Peter Voigt und Dr. Ullrich Stelzl.

Uwe Eising und Hans-Joachim Stahl danke ich für die engagierte Hilfe bei der Überwindung aller anfallenden EDV-Probleme.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, im Speziellen meiner Mutter Yvonne Tenner-Paustian und meiner Großmutter Marianne Wedekind, für ihre kontinuierliche und liebevolle Unterstützung.



## Publikationen

Langenickel T.H., Pagel I., Buttgereit J., **Tenner K.**, Lindner M., Dietz R., Willenbrock R., Bader M. (2004): Rat corin gene: molecular cloning and reduced expression in experimental heart failure, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* (Band 287), Nr.4, Seite 1516-21.

**Tenner K.**, Walther D., Bader M. (2007): The influence of human tryptophan hydroxylase N- and C-terminus on enzymatic activity and oligomerization, *J. Neurochem.* (im Druck).

**Tenner K.**, Voigt J.-P., Qadri F., Bader M. (2007): The mTPH2 C1473G single nucleotide polymorphism is not responsible for behavioural differences between mouse strains, (bei *Nature Neuroscience* als *short communication* eingereicht).

## Patente

Sofroni D., Gutu L., Cernii A., **Tenner K.**, Todiras M., Bader M. "Diagnostic method of endometrial cancer". Positive decision nr. 4956 from 2006-11-20, State Agency on intellectual property of the Republic of Moldova.

Sofroni D., Gutu L., Cernii A., **Tenner K.**, Todiras M., Friptu V., Cardaniuc C., Bader M. "Method for appreciation of endometrial cancer aggressivness". Positive decision nr. 4997 from 2006-12-26, State Agency on intellectual property of the Republic of Moldova

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der gemäß § 6 Absatz (3) in der Promotionsordnung vom 19.06.2002 angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt wurde, dass ich mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad beworben habe oder einen entsprechenden Doktorgrad besitze, und dass mir die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 19.06.2002 bekannt ist.

Katja Tenner

Berlin, den 16.04.2007